



TITLE:

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼにおける触媒機能とアロステリック効果発現の分子的基础に関する研究:一次構造決定と触媒部位および制御部位の推定(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

石 嶋, 純男

CITATION:

石 嶋, 純男. ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼにおける触媒機能とアロステリック効果発現の分子的基础に関する研究:一次構造決定と触媒部位および制御部位の推定. 京都大学, 1986, 理学博士

ISSUE DATE:

1986-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k3443>

RIGHT:

新制
理
517

京大附図

学位申請論文

石 鳥 純 男

学位申請論文

主論文題目

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼに
おける触媒機能とアロステリック効果発現
の分子的基础に関する研究：一次構造
決定と触媒部位および制御部位の推定

石 蔦 純 男

京都大学大学院

理学研究科（化学専攻）

博士後期課程

（昭和61年3月研究指導認定見込）

	頁
I. 序論	1
I-1. アロステリック酵素の分子構造	1
I-2. PEP carboxylase	5
I-3. 本研究の目的と結果の要点	10
II. 材料および方法	13
II-1. 実験材料	13
(1) 試薬	13
(2) タンパク質および酵素	15
II-2. 大腸菌株とその培養	16
II-3. PEP carboxylase の精製	17
(1) ヘキシル-Sepharose の合成	17
(2) PEP carboxylase の精製操作	18
II-4. PEP carboxylase の活性測定	21
II-5. タンパク質および PEP carboxylase の定量	22
II-6. アミノ酸分析	22
II-7. 電気泳動	22
II-8. アミノ酸配列の決定	23
II-9. N-末端および C-末端 trypsin 分解ペプチド の調製	24

II-10.	ヒドロキシルアミンによるペプチド結合の 選択的切断	26
II-11.	PEP carboxylase の DACM による修飾	26
II-12.	DACM で修飾した PEP carboxylase の trypsin 分解	27
II-13.	HPLC によるペプチドの分離	28
II-14.	コンピュータによるアミノ酸配列の解析	29
III.	結果	31
III-1.	精製法の改良	31
III-2.	PEP carboxylase の一次構造	37
(1)	N-末端領域のアミノ酸配列	37
(2)	C-末端領域のアミノ酸配列	43
(3)	ヒドロキシルアミン処理による Asn-Gly 結合の 切断	44
(4)	DACM で修飾されたシステイン残基を含む trypsin 分解ペプチドのアミノ酸配列	48
III-3.	触媒活性に必要なシステイン残基の同定	53
(1)	システイン残基の DACM による修飾の時間経過 と酵素失活との関係	53
(2)	ホスホ乳酸によって保護されるシステイン残基	55

Ⅲ-4. Anacystis nidulans の PEP carboxylase との
一次構造の比較

59

Ⅳ. 考察

65

Ⅳ-1. 均一酵素標品の簡便な調製法の確立

66

Ⅳ-2. PEP carboxylase の一次構造

68

Ⅳ-3. PEP carboxylase のシステイン残基

71

Ⅳ-4. 他の生物種の PEP carboxylase および
他の酵素・タンパク質との一次構造の比較

75

要約

82

謝辞

85

文献

87

- 。本論文では、The Journal of Biochemistry で認められている公認略号の他に、以下の略号を用いた。

PEP ホスホエノールピルビン酸

ダンシル 5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホン

HEPES N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-2-エタン
スルホン酸

SDS ドデシル硫酸ナトリウム

DACM N-[7-(ジメチルアミノ)-4-メチルクマリニル]マレイミド

HPLC 高速液体クロマトグラフィー

- 。図8, 図11 および 図14においては、下に示す1文字表示を用いてアミノ酸配列を表わした。

A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly;

H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn;

P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val;

W, Trp; Y, Tyr。

- 。図, 表, 式は、標題ならびに説明文を除き英語で記した。本文中、タンパク質・酵素名の表示には英語を使用した。また、英語で表現した方が理解しやすいと思われる場合には、部分的に英語を用いた。

I. 序論

I-1. アロステリック酵素の分子構造

アロステリック酵素は、通常、基質や反応生成物とは構造の異なる低分子化合物（アロステリック エフェクター）によって活性の調節を受ける酵素であり、生体内の代謝調節において重要な役割を担っている。

Umbarger によって最終産物による初発反応のフィードバック阻害が見出されて以来、多くのアロステリック酵素について、エフェクターによる活性調節機構が分子レベルで研究されてきた²⁾。これまでに知られているアロステリック酵素は、いずれも複数個のサブユニットの会合体として機能しており、同一種のサブユニットから成る場合もあれば、異種サブユニットから成る場合もある。大腸菌の aspartate transcarbamylase は 2 種類のサブユニットから構成され、一方のサブユニットは触媒活性を、他方のサブユニットはエフェクターとの結合部位をもっている³⁾。これに対して、申請者が

研究を行なった大腸菌の PEP carboxylase のように 同一種のサブユニットから成るアロステリック酵素では、一本のサブユニットポリペプチド上に活性部位と制御部位をもつことになる。

そこで、同一種のサブユニットから成るアロステリック酵素では、活性部位と制御部位が一次構造上どのように配置されているのか、興味の一つの対象となる。一方、個々のアロステリック酵素をみると、エフェクターの種類や数は、生物種によって多様性に富んでいる。このことから、アロステリック酵素の分子構造と併行して、アロステリックな調節機能の分子進化上の獲得機構が考察されている。特定の酵素において、アロステリックな性質の異なる酵素の一次構造を比較した結果、いくつかの酵素の制御部位はアミノ酸残基の置換が積み重なることによって生成してきたものと考えられている。しかし、一方ではエフェクターの結合部位はそれぞれ独自のドメインを構成し、進化の過程において、ドメイン単位の遺伝子の融合あるいは交換（例えば、エキソンの

混合 (exon shuffling)⁴⁾) が起こると によって
アロステリックな機能が獲得されてくるとする考えも
提出されている⁵⁾。さらには、ウシ肝臓の glutamate
dehydrogenase において、遺伝子の重複が起こったこと
が示唆され⁶⁾、遺伝子の重複もアロステリックな調節
機能の獲得に寄与しているものと考えられている。

遺伝子の重複は、最近、大腸菌の carbamoyl-phosphate
synthetase の大サブユニット⁷⁾、大腸菌の二種類の
aspartokinase - homoserine dehydrogenase⁸⁾ および
ウサギ筋肉の phosphofructokinase⁹⁾ などにおいても
示唆されている。これまでに、アロステリック酵素の
脱感作は、数多くの酵素について行なわれてきた。

しかし、非アロステリック酵素に人為的に調節機能を
付与した例はない。近年、遺伝子操作技術が進歩
したために、特定の酵素の特定の領域をコードする
遺伝子部分を組換えたり、特定のアミノ酸残基を
他のアミノ酸残基に置換することが可能になってきた。

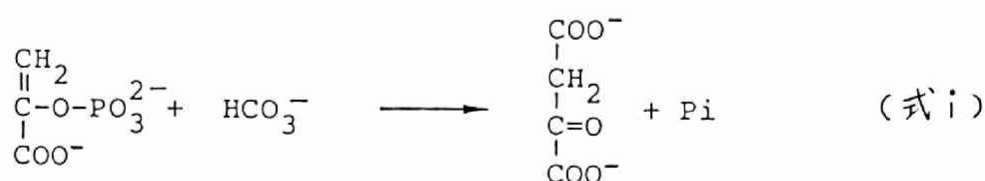
このような方法によって、エフェクター感受性を特定の
酵素に付与することができれば、アロステリック酵素
の分子構造や分子進化について、大きな示唆が得ら

れるものと思われる。

アロステリック酵素の分子構造については、これまで大腸菌の aspartate transcarbamylase、Bacillus stearothermophilus の phosphofructokinase、およびウサギ筋肉の glycogen phosphorylase a および b などについて、最も多面的な研究が進められ、多くの知見が得られている^{5), 10)}。しかし、アロステリック酵素は、一般に分子量が大きいため構造解析が比較的困難である。したがって、全一次構造や高次構造が解明された例は極めて少ない。これに対して、最近、遺伝子 DNA の塩基配列を決定し、それからアロステリック酵素の一次構造が推定できるようになってきた。アロステリック酵素の分子構造を明らかにし、特に、触媒機能や調節機能に関与するアミノ酸残基の一次構造上ならびに高次構造上の位置関係を明らかにすることは、タンパク質化学的見地から極めて興味深いテーマの一つである。このような研究が、いくつかの酵素についてようやく開始されつつある。

I-2. PEP carboxylase

PEP carboxylase [EC 4.1.1.31] は、 Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} の存在下に 式 i に示す反応を触媒する^{11), 12)}。本



酵素は、全ての植物組織、緑藻、原生動物 および多くの細菌に存在し、 C_4 二塩基酸としてのオキサロ酢酸をトリカルボン酸サイクルに供給することによって、このサイクルの回転、ならびにサイクルの生合成的代謝機能を維持する アナプレロティック (anaplerotic) な役割を果たしている¹³⁾。また、植物のなかでも、トウモロコシやサトウキビなど C_4 -植物と呼ばれる高い光合成能をもつ一群の植物^{14), 15)} やサボテンなどの多肉植物¹⁶⁾ では、本酵素が、炭素固定に特に重要な役割を果たしている。このため、本酵素の遺伝子は、遺伝子操作技術を用いた植物育種のための重要な研究対象の一つと考えられている¹⁷⁾。本酵素は、すでに10種近くの生物種から均一に精製され、分子的研究がなされている。Cánovas と Kornberg¹⁸⁾、Nishikido ら¹⁹⁾、および

Sanwal と Maeba²⁰⁾ による PEP carboxylase のアロステリック エフェクター の発見を契機として、PEP carboxylase のアロステリック な性質が調べられた。多くの生物種の PEP carboxylase はアロステリック 酵素である。しかも、その活性調節因子は、生物種によって著しい多様性をみせ、このような多様性が、酵素分子のどのような構造的相違を基にして生じているかに興味をもたれている。

表Iは、Utter と Kolenbrander の分類¹¹⁾に従って、PEP carboxylase をエフェクターの種類によって大別したものである。第一 (Class 1) は、アセチル-CoA によって活性化されるもの、第二 (Class 2) は、C₄ ジカルボン酸またはトリカルボン酸サイクルの中間体によって阻害されるもの、第三 (Class 3) は、エフェクターをもたないもの、および第四 (Class 4) は、これらのいずれにも属さないものである。本酵素の反応機構については、以前、Maruyama ら²¹⁾によって協奏的反応機構が提出された。しかし、最近、段階的反応機構を支持する知見が集積されつつある²²⁾⁻²⁴⁾。これらの反応機構は、基質または基質アナログを用いた解析によって導かれており、酵素タンパク質のアミノ酸残基との相互作用を

表I. 種々の生物種の PEP carboxylase のエフェクター^{11), 12), 25)}

Class	Source	Activators	Inhibitors
1	<u>Escherichia coli</u>	acetyl-CoA fructose 1,6-bisphosphate GTP, ppGpp fatty acids	L-aspartate (L-malate)
	<u>Salmonella typhimurium</u>	acetyl-CoA fructose 1,6-bisphosphate GTP, CDP	L-aspartate
	<u>Brevibacterium flavum</u>	acetyl-CoA fructose 1,6-bisphosphate	L-aspartate
	<u>Ferrobacillus ferrooxidans</u>	acetyl-CoA	L-aspartate
	<u>Streptococcus bovis</u>	acetyl-CoA	L-aspartate
	<u>Thiobacillus thiooxidans</u>	acetyl-CoA	—
	<u>Tetrahymena pyriformis</u>	acetyl-CoA	—
	<u>Thermus aquaticus</u>	acetyl-CoA	—
2	<u>Thiobacillus thioparus</u>	—	L-aspartate L-malate
	<u>Euglena gracilis</u>	—	citrate oxaloacetate
	<u>Acetobacter xylinum</u>	—	succinate ADP
	<u>Acetobacter suboxydans</u>	—	L-aspartate
	C ₄ -plants		
	monocotyledonous	glucose 6-phosphate glycine	L-malate L-aspartate
	dicotyledonous	glucose 6-phosphate	L-malate L-aspartate
3	C ₃ -plants	—	—
	<u>Anacystis nidulans</u>	—	—
4	<u>Pseudomonas</u> MA	NADH	—

横線は、該当するエフェクターが見出されていないことを示す。

考慮に入れた解析を行なう段階には未だ到っていない。

これまでに、化学修飾およびアフィニティラベリングによる解析によって、本酵素の触媒機能の発現には、

システイン²⁶⁾⁻³¹⁾、ヒスチジン^{32), 33)}、アルギニン^{34), 35)}

およびリジン³⁶⁾残基が必須であることが報告されてきた。

しかし、本酵素のサブユニットポリペプチドの分子量は

概して大きく(約10万)、これらの必須アミノ酸残基を

含むペプチドの一次構造など、一次構造に関する知見は、

永年の間全く得られていなかった。

申請者らの研究室では、西城戸らが本酵素に対するアロステリックエフェクターを発見した¹⁹⁾。それ以来、大腸菌(*Escherichia*

coli)のPEP carboxylaseについて、複数のエフェクター

の発見³⁷⁾⁻⁴⁰⁾、均一精製と分子的諸性質の

解明^{27), 41)}、反応速度論的解析^{42), 43)}、化学修飾

法による触媒機能あるいは調節機能に必要な

アミノ酸残基の同定^{26)-29), 32), 34), 36), 44)}、*in vivo*における

酵素活性調節機構の解析^{43), 45)}など酵素学的な研究

が多面的に行なわれてきた。大腸菌のPEP carboxylase

は、アセチル-CoA、L-アスパラギン酸など、5種類もの

エフェクターによって複雑な活性調節を受け^{43), 45)}(表I

参照)、しかも、それぞれのエフェクターに対して独立の調節部位をもつと^{32), 34), 36), 46), 47)}、各エフェクターの結合によって多様な高次構造変化(allosteric transition)を起すこと^{26), 28), 34), 42), 47)-49)}が明らかにされているユニークなアロステリック酵素である。申請者らの研究室では、最近、本酵素遺伝子(ppc)のクローニングを達成し^{50), 51)}、PEP carboxylaseとしてはじめて、遺伝子DNAの全塩基配列を決定^{52), 53)}した。この配列からサブユニットポリペプチドのアミノ酸配列を推定することが可能となった。さらに、緑藻 Chlorella の PEP carboxylase の酵素学的研究⁵⁴⁾ や、ラン藻 Anacystis nidulans の PEP carboxylase の酵素学的研究⁵⁵⁾ ならびに遺伝子DNAの解析^{56), 57)}、トウモロコシ(Zea mays)の PEP carboxylase の cDNA の解析^{58), 59)} が進められている。また、一方では、遺伝子操作技術を用いて、PEP carboxylase の触媒機能の改変やアロステリックな調節機能の改変が試みられている。

I-3. 本研究の目的と結果の要点

酵素機能の発現機構や触媒反応の反応機構を解明するためには、酵素分子の構造を明らかにすること、特に、機能部位にあるアミノ酸残基を同定し、それらの配置やリガンドとの相互作用を明らかにすることが重要となる。

このためには、X線結晶構造解析による高次構造の解析や、NMR, ESR などの分光学的方法による解析などを含めた多面的な研究が必要とされる。それらは全て、一次構造に関する知見が基礎となり、必要不可欠である。

申請者らの研究室では、大腸菌 K-12 株の PEP carboxylase の遺伝子 DNA の塩基配列を決定した⁵²⁾。

これによって、サブユニットポリペプチドのアミノ酸配列を推定することが可能となったが、塩基配列からは、

39 塩基対離れた二つのメチオニンコドン (Met-1 と Met-14) がいずれも開始コドンとして考えることが可能であった。

遺伝子 DNA 上の翻訳領域を決定し、推定されたアミノ酸配列を確認するためには、N-末端、C-末端アミノ酸配列や、ペプチド結合の特異的切断によって生成したペプチド断片のアミノ酸配列など、酵素タンパク質のアミノ酸配列に関する知見が必要となる。このような

タンパク質化学的研究には、均一なタンパク質標品が大量に必要とされる。大腸菌の PEP carboxylase は、すでに、B 株⁶⁰⁾および W 株²⁷⁾ から均一に精製されているが、従来の方法は、7 段階以上の精製操作、長期間 (3-4 週間) を必要とし、しかも、得られる酵素量は決して充分ではなかった (湿重量 100 g の菌体から約 2 mg の均一酵素標品が得られていた)。そこで、本研究では第一に、できるだけ迅速かつ簡便に、しかも大量に本酵素の均一標品を調製する方法を確立した。第二に、サブユニットポリペプチドの N-末端や C-末端アミノ酸配列を決定し、さらに、サブユニットポリペプチドを化学的あるいは酵素的に切断することによって得られたペプチド断片を分析した。これらの知見と遺伝子 DNA に関する知見とを合わせて本酵素のサブユニットポリペプチドの全一次構造 (883 アミノ酸残基) を確定することができた。第三に、基質アナログを用いた解析を行ない、触媒活性に必須なシスチン残基の一次構造上の位置を化学修飾によって推定した。また、申請者らの研究室では、ラン藻 Anacystis nidulans の PEP carboxylase の遺伝子 DNA の塩基配列が決定され、これからサブユニット

ポリペプチドの一次構造が推定されている⁵⁷⁾。 A. nidulans の PEP carboxylase は、調べた限りでは エフェクターをもたない⁵⁵⁾ 点で、大腸菌酵素とは対照的である (表 I 参照)。そこで第四に、大腸菌酵素と A. nidulans 酵素の一次構造を比較し、PEP carboxylase の一次構造上で、保存されている領域と可変領域とを見出した。

II. 材料および方法

II-1. 実験材料

(1) 試薬

PEP シクロヘキシルアンモニウム塩は、Clark と Kirby の方法⁶¹⁾に従って本研究室で合成され、保存されていたものを用いた。本研究では、PEP は全てシクロヘキシルアンモニウム塩を用いた。DL-ホスホ乳酸は、Wagner-Jauregg の方法⁶²⁾に従ってバリウム塩として合成され、保存されていたものを、カリウム塩にかえて使用した。本研究では、ホスホ乳酸は、全て DL 体を用いた。ホスホ乳酸の定量は、試料に 60 % 過塩素酸を加え、それを直火で加熱して加水分解し、遊離した無機リン酸をリンバドモリブデン酸法⁶³⁾によって定量することにより行なった。アセチル-CoA は、Simon と Shemin の方法⁶⁴⁾に従って合成した。L-アスパラギン酸ナトリウム、ストレプトマイシン硫酸塩、NADH は協和醗酵工業社より購入した。本研究においては、L-アスパラギン酸は全てナトリウム塩を使用した。アンピシリンナトリウム塩は明治製菓社より、Coomassie brilliant blue G、ダンシルクロリド、ダンシル-アミノ酸キット、ヘフスタチン、ジチオトレイトール、

HEPES、L-1-(トシルアミド)-2-フェニルエチルクロロメチル
ケトン および グリセロール 2-リン酸は Sigma Chemical
社よりそれぞれ購入した。Sephadex 4B、Sephadex
CL-6B および Sephadex G-50 (fine) は、Pharmacia
Fine Chemicals 社より、AG50W-X4 (マイナス 400 メッシュ)
陽イオン交換体は、Bio-Rad 社より、それぞれ購入した。
アミノ酸自動分析用 アミノ酸混合標準液は味の素社より、
0.2% 3-(2-アミノエチル)インドール含有 4M メタンスルホン
酸は Pierce Chemical 社よりそれぞれ購入した。N-
エチルモルホリン および トリエチルアミンは、それぞれ、
ニンヒドリン (20 mg/ml) と 1 時間還流後蒸留し、
さらに水酸化カリウムを加えて再蒸留したのちに使用
した⁶⁵⁾。アミノ酸配列決定に用いた他の試薬は、
「アミノ酸配列決定用」のものを、和光純薬工業社
または半井化学薬品社より購入し、さらに精製すること
なくそのまま使用した。その他の試薬は、和光純薬
工業社または半井化学薬品社より購入した。なお、
本研究では、特にさとわらない場合でも、アミノ酸は
全て L 体を用いた。

(2) タンパク質および酵素

colicin-E1 は、Schwartz と Helinski の方法⁶⁶⁾に従い、大腸菌 K-12 由来株 BA 197 (Hfr H/ColE1) から抽出し、硫酸分画 (40-60% 飽和) により部分精製したものをを用いた。ウシ膵臓 trypsin (ジフェニルカルバミルクロリド処理を行なったもの) は、Sigma Chemical 社より購入し、Wang と Carpenter の方法⁶⁷⁾に従って、L-1-(トシルアミド)-2-フェニルエチルクロロメチルケトンでさらに処理した。酵母 carboxypeptidase Y はオリエンタル酵母工業社より購入し、Lee と Riordan の方法⁶⁸⁾に従ってペフオスタチンで処理した。ウシ血清 albumin、ウシ膵臓 carboxypeptidase A (ジイソプロピルフルオロリン酸処理を行なったもの) およびダイズ trypsin inhibitor は、Sigma Chemical 社より購入した。フタバ臓 malate dehydrogenase およびフタ膵臓 carboxypeptidase B (ジイソプロピルフルオロリン酸処理を行なったもの) は、Böhringer-Mannheim 社より購入した。

II-2. 大腸菌株とその培養

本研究において、PEP carboxylase を調製するために用いた大腸菌株は、JA200 / pLC 20-10 (F^+ , recA, leu, thr, Δ trpE5 / ColE1-ppc⁺)^{50), 69)} および PCR1 / pS3 (F^- , recA1, ppc-2, thi, thr, leu, arg, rpsL / pBR 322-ppc⁺)⁵¹⁾ である。これらの菌株は、それぞれ、遺伝子操作により大腸菌 K-12 株の本酵素遺伝子を組込んだプラスミド pLC 20-10^{50), 69)} あるいは pS3⁵¹⁾ をもつ。また、JA200、PCR1 はいずれも大腸菌 K-12 由来株である。

菌の培養に用いた液体培地の組成を表IIに示す。菌体を 5 ml の L-broth 液体培地に接種し、37°C で一夜振とう培養したのち、600 ml の液体合成培地で前培養し、これをさらに 10 l の液体合成培地に移し、28°C で 12 時間

表II 大腸菌の培養に用いた液体培地の組成^a

L-broth (pH 7.2)		Minimal medium	
Yeast extract	5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
Polypepton	10 g	Citric acid·1H ₂ O	2 g
NaCl	5 g	K ₂ HPO ₄ anhydrous	10 g
Glucose	1 g	Na(NH ₄)HPO ₄ ·4H ₂ O	3.5 g

^a 溶液 1 l 中に含まれる各成分の重量を示す。

振とう培養した。収体合成培地は、最少培地⁷⁰⁾にさらに Anraku が用いた微量金属塩溶液⁷¹⁾ および以下に示す添加物を加えた(溶液1ℓあたりに加えた重量で示す)。JA200/pLC20-10の培養の場合、グルコース、8g; ロイシン、140mg; トレオニン、140mg; トリプトファン、70mg; イソロイシン、70mg; バリン、70mg; チアミン塩酸塩、2mg。PCR1/pS3の場合、グルコース、5g; トレオニン、100mg; アルギニン、100mg; ロイシン、80mg; チアミン塩酸塩、3mg。また、プラスミド保持菌のみを選択的に増殖させるため、JA200/pLC20-10の培養では、L-broth収体培地に colicin E1 を、PCR1/pS3の培養では、全ての収体培地に 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にアンピシリンをそれぞれ加えた。培養後、得られた菌体は、100 mM Tris-H₂SO₄ 緩衝液(pH 7.4)を用いて洗浄したのち、必要時まで -80°C で凍結保存した。

II-3. PEP carboxylase の精製

(1) ヘキシル-Sepharose の合成

PEP carboxylase の精製に用いたヘキシル-Sepharose は、Sepharose 4B を March らの方法⁷²⁾に従い臭化シアンで活性化し、Shaltiel の方法⁷³⁾に従ってヘキシルアミンと

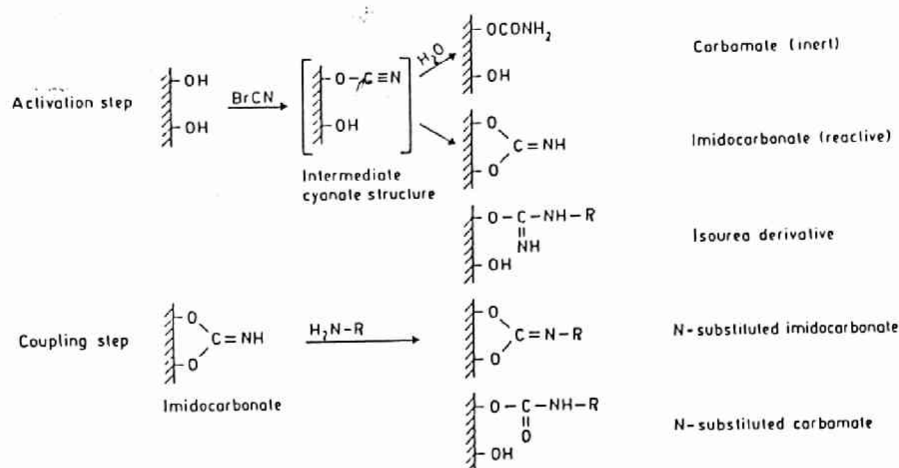


図1. Sepharose の活性化反応 およびカップリング反応の想定図

カップリングさせることにより合成した⁷⁴⁾。活性化反応 およびカップリング反応は、図1に示すように進行すると考えられている⁷⁵⁾。得られたヘキシル-Sepharose の解離基を Yon と Simmonds の方法⁷⁶⁾に従って滴定した結果、解離基の濃度は、ゲル 1 ml あたり $19.6 \mu\text{mol}$ であった。ゲルは、0.02% 窒化ナトリウム水溶液中に懸濁し、 4°C で保存した。

(2) PEP carboxylase の精製操作

操作は、全て $0-4^\circ\text{C}$ において行なった。

菌体をほぼ等容量の 100 mM Tris- H_2SO_4 緩衝液 (pH 7.4) (緩衝液 A) に懸濁し、終濃度が 10 mM になるように L-アスパラギン酸を加えたのち、フレンチプレス (大岳製作所製)

により、 $1,000 - 1,350 \text{ kg/cm}^2$ に加圧して菌体を破碎した。
 $14,000 \times g$ 、30分間遠心分離して上清をとり、沈殿は、
少量の緩衝液Aに再び懸濁して遠心分離し、その上清を
先の上清とあわせて粗酵素液とした。

粗酵素液に、最終濃度が2% (w/v) になるように硫酸ストレプト
マイシン水溶液(20%)を加えた。pH6.6になるように0.2M
硫酸を加えたのち20分間攪拌し、遠心分離により核酸を
ストレプトマイシンとの複合体の沈殿として除いた。

上清に0.1M Tris水溶液を加えて再びpH7.4に合わせたのち、
硫酸アンモニウム飽和水溶液を加えて40%飽和とした。
30分間攪拌したのち遠心分離し、その上清をとった。この
上清にさらに硫酸アンモニウム飽和水溶液を加え、52%飽和
とし、攪拌、遠心分離してその沈殿をとった。沈殿を少量の
緩衝液Aに溶解し、25-50倍容の50mM Tris- H_2SO_4
緩衝液(pH7.4)に対して一夜透析を行なった。この間に
外液を1回交換した。

透析後、最終濃度が700mMになるように硫酸アンモ
ニウムを加え、ヘキシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーを
行なった。ヘキシル-Sepharose カラム($3.1 \times 17.6 \text{ cm}$)を、
700mM 硫酸アンモニウムを含む50mM Tris- H_2SO_4

溶液(開始溶液)で平衡化し、透析した40-52%飽和硫酸アンモニウム分画液を加えた。バッド容量の約10倍容量の開始溶液でカラムを洗浄したのち、開始溶液にさらに10 mM L-アスパラギン酸を含む溶離溶液に切り換え、PEP carboxylase を溶出させた。カラムは、その後さらに100 mM 硫酸アンモニウムを含む50% (v/v) エチレングリコール溶液で洗浄した。PEP carboxylase 活性を含む画分を集め、20 mM L-アスパラギン酸および20 mM 硫酸マグネシウムを含む100 mM Tris-H₂SO₄ 緩衝液(pH 7.4)に対して一夜透析し、メンブレンフィルター(Diaflo メンブレン PM30、Amicon 社製)を用いて濃縮した。ペプチド分析を行なう試料については、低分子物質をさらにできるだけ除くために、20 mM L-アスパラギン酸および20 mM 硫酸マグネシウムを含む100 mM Tris-H₂SO₄ 緩衝液(pH 7.4)で平衡化した Sepharose CL-6B カラム(1.3 x 77 cm)を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。得られた酵素標品は、硫酸アンモニウムを加えて硫酸アンモニウム60%飽和の懸濁液として4℃で保存した。酵素標品は、この条件下で、活性を失うことなく少なくとも一年間は保存することができた。保存した酵素を実験に用いる場合には、以下の処理を行なった。酵素の懸濁液を

少量の緩衝液 A に溶解し、最終濃度が 1 mM になるようにジチオトレイトールを加え、0°C で 1 時間放置した。その後、次の実験に用いる緩衝液に対して 4°C で一夜透析した。

II-4. PEP carboxylase の活性測定

PEP carboxylase の活性は、malate dehydrogenase との共役反応系を用いて、分光学的に測定した⁴¹⁾。活性測定反応液の組成を表 III に示す。本酵素は、アクチベーター非存在下

表 III. 活性測定反応液の組成^a

PEP	2 mM
KHCO ₃	10 mM
MgSO ₄	10 mM
NADH	0.1 mM
Malate dehydrogenase	1.5 IU
Dioxane	1.1 M ^b
Tris-H ₂ SO ₄ buffer (pH 8.5)	100 mM

^a 全容 1 ml。 ^b 10% (v/v)。

では極めて低い活性しか示さないもので、反応液には非生理的アクチベーターであるジオキサン⁷⁷⁾を加えた。酵素溶液を除く反応液を 30°C でフレインキュベーションしたのち、酵素溶液を添加して反応を開始させ、NADH の酸化に伴う 340 nm の吸光度の減少速度を測定した。吸光度の減少速度の測定は、日立 124 型 または 220 型分光光度計を用い、NADH の 340 nm の吸光係数として $\epsilon_{340} = 6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いた。この測定により、1 分間に 1 μmol の NADH を酸化する活性を 1 単位とし、タンパク質 1 mg あたりの活性を比活性と

定義した。

II-5. タンパク質 および PEP carboxylase の定量

精製操作中のタンパク質の定量は、ウシ血清 albumin を標準として Bradford の方法⁷⁸⁾に従って行なった。他の分析においては、特に示さない限り、PEP carboxylase およびそのペプチド断片は、減圧下に定沸点塩酸により 110°C、24 時間加水分解後アミノ酸分析を行なうことにより定量した。

II-6. アミノ酸分析

通常のアミノ酸分析は、協和精密 K-101-AS 型アミノ酸分析計（ワンカラム法）を用いて行なった。トリフトファンを定量する場合のみ、日立 KLA-3 型アミノ酸分析計（ツウカラム法）を用いた。

II-7. 電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Davis の方法⁷⁹⁾に従って行なった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Weber と Osborn の方法⁸⁰⁾に従って行なった。泳動後のタンパク質は、

通常は、Coomassie brilliant blue R-250 を用いて染色した。ポリペプチドのゲルからの回収は、Weber と Osborn の方法⁸¹⁾に従って行なった。その際、ゲルの中のポリペプチドのバンドは、ゲルを 4°C に冷やすことにより検出した⁸²⁾。

II-8. アミノ酸配列の決定

ポリペプチドの N-末端アミノ酸残基は、Gray の方法⁸³⁾に従って、ダンシル法により決定した。ダンシル-アミノ酸は、ポリアミド二次元 TLC により同定した⁸⁴⁾。自動 Edman 分解は、Applied Biosystems model 470A 気相プロテインシーケンサー (住友化学宝塚総合研究所, 宝塚) を用いて行なった。フェニルチオヒダントイン-アミノ酸は、DuPont Zorbax C8 カラム、酢酸ナトリウムを含む溶媒系 (pH 4.5) を用い、アセトニトリルの 38-65 % (v/v) の段階的濃度勾配によって展開する HPLC⁸⁵⁾により同定した。SDS ゲルから回収したペプチド断片の N-末端領域のアミノ酸配列は、Weiner らの方法⁸⁶⁾に従ってダンシル-Edman 法により決定した。ペプチドのアミノ酸配列は、Gray の方法⁸⁷⁾に従ってダンシル-Edman 法により、あるいは、Konigsberg の方法⁸⁸⁾に従って消去 Edman 法により決定した。

II-9. N-末端 および C-末端 trypsin 分解ペプチドの調製

N-末端 および C-末端 trypsin 分解ペプチドは、Zabin と Fowler の方法⁸⁹⁾に従って調製した。C-末端 trypsin 分解ペプチドは次の様にして調製した。0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) に対して透析した約 7 mg の PEP carboxylase を含む溶液に、915 mg の塩酸グアニジンを加え、攪拌して溶液とした (容量は約 1.6 ml となった)。氷冷後、18 mg の無水マレイン酸を加えた。その後、4°C で 15 分間放置して、酵素のアミノ基をマレイル化した。この間、Radiometer 社 Titration Assembly (TTA 60) を用いて、1M 水酸化ナトリウム水溶液を加えることにより pH を 8.3 に保った。0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) に対して透析することにより、塩酸グアニジン および 反応副生成物を除いたのちに、得られたマレイル化酵素を 80 μ g の trypsin で分解した。30°C で 1 時間 インキュベーションしたのち、80 μ g の trypsin を反応混液に再び加え、インキュベーションをさらに 1 時間続けた。その後、上と同様に pH を保ちながら、24 mg の無水マレイン酸を加え、生成した全ての trypsin 分解ペプチドの α -アミノ基をマレイル化した。次に、溶液に酢酸を加えて pH を 3.5 に調整し、生じた沈殿を遠心分離によって除いたのち、上清を、

あらかじめ 0.1M 酢酸で平衡化しておいた AG50W-X4 のカラム (Econo-Column Polypropylene Column, Bio-Rad 社製、バッド容量 7ml) に添加した。0.1M 酢酸をカラムに流し、陽電荷をもたないペプチドのみがカラムに吸着しないことを利用して、唯一つ アルギニン残基をもたない C-末端ペプチドを溶出させた (溶出液の容量、20ml)。得られたペプチドは、溶液をそのまま 37°C で 30 時間 インキュベーションすることにより脱マレイル化処理した。

N-末端 trypsin 分解ペプチドの調製においては、再マレイル化の代わりに、trypsin 分解物を carboxypeptidase B で処理した。これ以外は上と同じ操作を行なった。すなわち、約 7mg のマレイル化酵素の trypsin 分解物に、80 μ g の carboxypeptidase B を加え、30°C で 2 時間 インキュベーションすることにより、全ての trypsin 分解ペプチドの C-末端の アルギニン残基を除いた。溶液に酢酸を加えて pH を 3.5 に調整し、遠心分離後、上清を AG50W-X4 のカラムに添加した。0.1M 酢酸をカラムに流し、 α -アミノ基がマレイル化されているために唯一つ陽電荷をもたない N-末端ペプチドを溶出させた。得られたペプチドは、溶液を 37°C で 30 時間 インキュベーションすることにより脱マレイル化処理した。

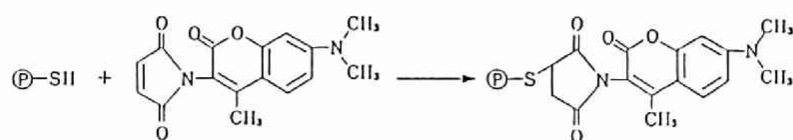
II-10. ヒドロキシルアミンによるペプチド結合の選択的切断

PEP carboxylase のヒドロキシルアミン分解は、Bornstein と Balian の方法⁹⁰⁾に従って行なった。PEP carboxylase を水に対して透析し、凍結乾燥した。これを一度トリフルオロ酢酸に溶解後、トリフルオロ酢酸を除去する処理を行なった。この処理によって切断収率が高くなることが報告されている⁶⁵⁾。

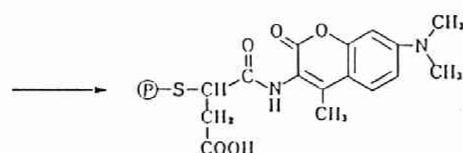
この試料を、6M 塩酸グアニジン および 2M ヒドロキシルアミン塩酸塩を含む 0.2M K_2CO_3 -LiOH 水溶液 (pH 9.0) に、タンパク質濃度が 2 mg/ml になるように溶解し、45°C で 4 時間 インキュベーションした。ギ酸を加えて反応を止め、透析により低分子化合物を除いた。

II-11. PEP carboxylase の DACM による修飾

一般に、タンパク質の SH 基と DACM との反応は、式 ii に示す



(式 ii)



反応式に沿ってすすむものと考えられている⁹¹⁾。

PEP carboxylase を、0.1M HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、最終濃度が 1mM になるように硫酸マンガン水溶液および全SH基の2.4倍モル過剰のDACMを加えて、30°Cでインキュベーションした。反応液にさらに他の添加物を加えた場合は、「結果」の項にその都度記した。DACMはアセトン溶液として加えた。最終的なアセトン濃度は5% (v/v) であった。アセトンは、本酵素のアロパターとしても作用し⁷⁷⁾、この条件下での酵素のPEPに対する K_m 値は約1mMであった。修飾反応は、最終濃度10mMのジチオトレイトールを反応混液に加えることにより止めた。過剰の試薬や副生成物を除き、かつ、付加反応物をスクシンイミド環の開環した安定な反応物に換える(式ii参照)ために、DACMで修飾した酵素を0.1M Tris-H₂SO₄ 緩衝液 (pH 9.0) に対し、27°Cで20時間透析した⁹¹⁾。

II-12. DACMで修飾したPEP carboxylaseのtrypsin分解

DACMで修飾したPEP carboxylaseを、0.1mM塩化カルシウムを含む0.1M炭酸水素アンモニウム水溶液に対して透析したのち、PEP carboxylaseの1%重量のtrypsinを加え、

37°C で 2 時間 インキュベーションした。その後、再び同量の trypsin を加え、インキュベーションを 37°C でさらに 4 時間続けた。反応は、反応混液を凍結乾燥することにより止めた。

II-13. HPLC によるペプチドの分離

DACM で標識された trypsin 分解ペプチドは HPLC によって分離した。HPLC は、Spectra Physics SP8700 高速液体クロマトグラフを用いて行なった。イオン交換 HPLC では、東洋曹達工業 TSK DEAE-5PW カラム および 炭酸水素アンモニウムを含む溶媒系を用いた。ペプチドは、25°C 0.5 ml/min の流速で、40 分間で 10 mM から 0.5 M まで、次に 20 分間で 0.5 M から 1 M までそれぞれ直線的に炭酸水素アンモニウムの濃度を高くすることにより溶出させた。逆相 HPLC では、Waters Associates μ Bondapak C18 カラム および 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 あるいは 0.1% (w/v) 酢酸アンモニウムを含む溶媒系を用いた。ペプチドは、40°C、1.5 ml/min の流速で、60 分間で 0% から 60% (v/v) まで直線的にアセトニトリルの濃度を高くすることにより溶出させた。溶出液の紫外吸収 (220 nm または

225 nm) および 蛍光強度 (励起波長 380 nm、蛍光波長 480 nm⁹¹⁾) を、それぞれ東洋曹達工業 UV-8 model II 分光光度計 および 島津製作所 RF-530 型分光蛍光スキャトロモニターを用いて連続して追跡した⁹²⁾。trypsin 分解物中の DACM 修飾ペプチドのペプチドマッピング法による分析は、トリフルオロ酢酸を含む溶媒系を用いた逆相 HPLC により行なった。この分析では、カラムに添加した trypsin 分解物の量は、蛍光をもたないペプチドの紫外吸収ピークの面積から、DACM で修飾されたペプチドの量は、対応する蛍光ピークの面積からそれぞれ求めた。

II-14. コンピュータによるアミノ酸配列の解析

大型コンピュータによるアミノ酸配列の解析は、京都大学化学研究所計算機センターにおいて行なった。大腸菌と A. nidulans の PEP carboxylase のアミノ酸配列を比較する時には、Goad と Kanehisa のアルゴリズム⁹³⁾を用いて、できるだけ相同性が高くなるように二つの配列を並べた。この際の計算は、Dayhoff らの数値 (mutation data matrix⁹⁴⁾、bias = 0、penalty = 8) を用いて行なった。また、二つのタンパク質のアミノ酸配列の相同性は、Kubota らの

方法⁹⁵⁾に従って「correlation coefficient」を計算することにより定量的に評価した。この方法は、タンパク質のなかで三次構造において相同性が高い領域を同定するために有用であることが示されている^{96), 97)}。なお、大型コンピュータを用いたアミノ酸配列の比較は、京都大学化学研究所大井龍夫教授、西川建博士ならびに金沢大学医療技術短期大学部 中島広志博士との共同研究である。

Ⅲ. 結果

Ⅲ-1. 精製法の改良

申請者らの研究室では、大腸菌 K-12 株の PEP carboxylase の遺伝子 (*ppc*) をマルチコピープラスミド (ColEI および pBR322) をベクターとしてクローニングした^{50), 51)}。このようなプラスミド (それぞれ、pLC 20-10 および pS3) をもつ大腸菌 JA200/pLC 20-10 および PCR1/pS3 では、遺伝子増量効果 (gene dosage effect) により細胞内の本酵素含量が高く、粗酵素液の本酵素比活性が、プラスミドをもたない野性株 (W3110) の約 10-20 倍であることが示されている。一方、大腸菌の PEP carboxylase は、高濃度の硫酸アンモニウム存在下にヘキシル-Sepharose ゲルに吸着するが、硫酸アンモニウムの濃度を一定に保ったままリガンドの一つである L-アスパラギン酸を添加すると、本酵素はアロステリック転移を起こしてゲルから溶出することが、Izui らによって明らかにされている⁷⁴⁾。そこで、本研究では、この溶出法を利用して、JA200/pLC 20-10 または PCR1/pS3 からできるだけ簡便に、しかも大量に、均一な酵素標品を調製する方法の確立を試みた。湿重量 137 g の JA200/pLC 20-10 から得られた粗酵素液を除核酸処理

したのち、従来の精製法の第一段階である硫酸アンモニウム分画を行なっただけの標品に対して、ヘキシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーを行なった。PEP carboxylase のヘキシル-Sepharose ゲルへの吸着は、主に疎水的相互作用によるため⁷⁴⁾、吸着の度合は共存させる硫酸アンモニウムの濃度に大きく依存する。したがって、精製操作をできるだけ簡略化するためには、最も効果的に酵素がゲルに吸着し、しかも L-アスパラギン酸を添加することによって効率よく酵素がゲルから溶出してくる塩濃度を設定することが重要となる。そこで、酵素標品をヘキシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーにかける前に、共存させる硫酸アンモニウムの濃度をバッチ法⁷⁴⁾により検討した。図2は、硫酸アンモニウムの濃度を变化させたときの酵素のゲルへの吸着を、10 mM L-アスパラギン酸存在下および非存在下のそれぞれにおいて調べた結果を示す。この結果から、カラムクロマトグラフィーにおいて共存させる硫酸アンモニウムの濃度を 700 mM と設定した。すなわち、この濃度では、L-アスパラギン酸非存在下では全酵素活性の約 90 % がゲルに吸着されたが、L-アスパラギン酸を添加すると、吸着率は約 20 % にまで低下

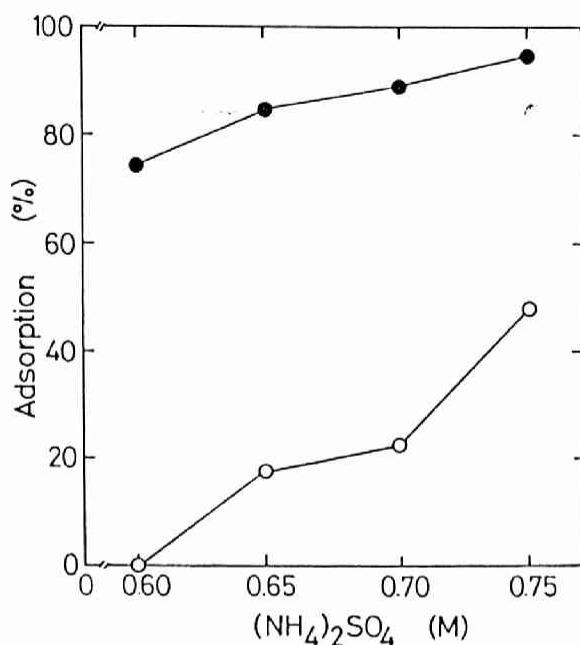


図2. 種々の濃度の硫酸アンモニウム存在下での PEP carboxylase の α キシル-Sepharose ゲルへの吸着とそれに及ぼす L-アスパラギン酸の添加効果

10 mM の L-アスパラギン酸存在下 (○) および 非存在下 (●) に、図に示した濃度の硫酸アンモニウムを含む 100 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7.4) 溶液にゲル

を加え、平衡化した。次に、PEP carboxylase の部分精製標品 (比活性 9.3) を 0.75 単位加え、全量を 1 ml とした。室温で 30 分間攪拌後、遠心分離 (5,700 × g) し、上清の酵素活性を測定⁷⁴⁾して、酵素のゲルへの吸着率を求めた。

した。このような条件を用いて、 α キシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーを行なった (図3)。硫酸アンモニウム分画液をカラムに添加後、カラムに吸着しないタンパク質を除くために、L-アスパラギン酸を含まない開始溶液でカラムを洗浄した。この時、大量のタンパク質が溶出したが、PEP carboxylase 活性は検出されなかった。PEP carboxylase は、硫酸アンモニウムの濃度を一定に保ったまま、10 mM L-アスパラギン酸を含む溶離溶液に切り

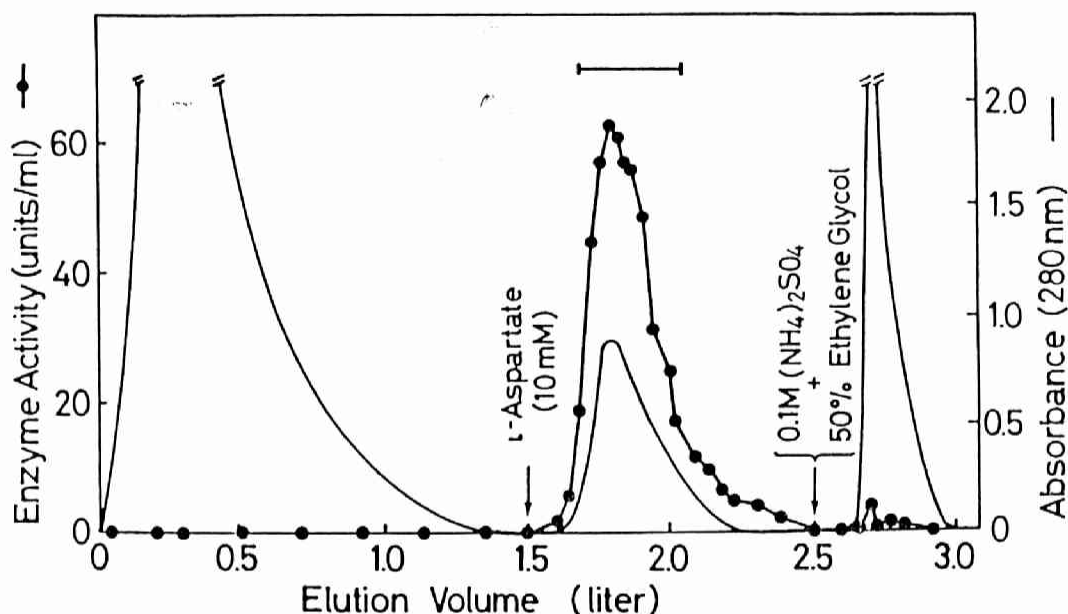


図3. PEP carboxylase の Δ キシル-Sepharose カラム
クロマトグラフィー

硫酸アンモニウム分画後の酵素標品(2.530 mg タンパク質)を、700 mM 硫酸アンモニウム共存下に Δ キシル-Sepharose カラム(3.1 x 17.6 cm、ベッド容量約130 ml)に吸着させた。開始溶液を用いてカラムを洗浄したのち、矢印で示す時点で、10 mM L-アスパラギン酸を含む溶離溶液に切り換えて PEP carboxylase を溶出させた。その後さらに、100 mM 硫酸アンモニウムを含む50% (v/v) エチレングリコール溶液を用いてカラムを洗浄した。溶出液の280 nmにおける吸光度を追跡(—)し、さらに、10 ml ずつ分画してその酵素活性を測定(●)した。図中水平の棒で示す画分を集め、ゲル電気泳動による純度検定(図4)を行なった。

換えることにより溶出した。PEP carboxylase が溶出したのち、カラムに吸着しているタンパク質をできる限り溶出させてしまうために、硫酸アンモニウムの濃度を100 mMに下げ、エチレン

グリコールを 50 % (v/v) 含む溶液を用いてカラムを洗浄した。かなり大量のタンパク質が溶出し、ゲルはこの後さらに、Shaltiel の方法⁷³⁾に従って洗浄したところ、少なくとも 4 回は再使用が可能であった。ヘキシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーの結果得られた酵素標品の比活性は 84.3 単位/mg タンパク質であり、大腸菌 W 株の均一精製酵素標品の比活性 88 単位/mg タンパク質²⁷⁾ とほぼ等しいものであった。各精製段階における酵素標品の純度を、SDS-ポリアクリルアミドゲルおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動により検定した(図4)。ヘキシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより得られた酵素標品は、以前、大腸菌 W 株より精製された酵素標品⁷⁴⁾と同じ泳動度の位置に、SDS を含む系(A)では 1 本のバンド、SDS を含まない系(B)では 2 本のバンドを与えた。SDS を含まない系(B)の条件下で PEP carboxylase が 2 本のバンドを与える現象は、以前より W 株の酵素において観察されており、バンド(a)は元来の四次構造を保持した分子種、バンド(b)は、泳動中に解離した分子種に相当するものと考えられている⁴¹⁾。得られた酵素標品には、PEP carboxylase 以外のタンパク質のバンドはみられず、電気泳動的に均一な酵素標品を得ることができた。以上の精製の

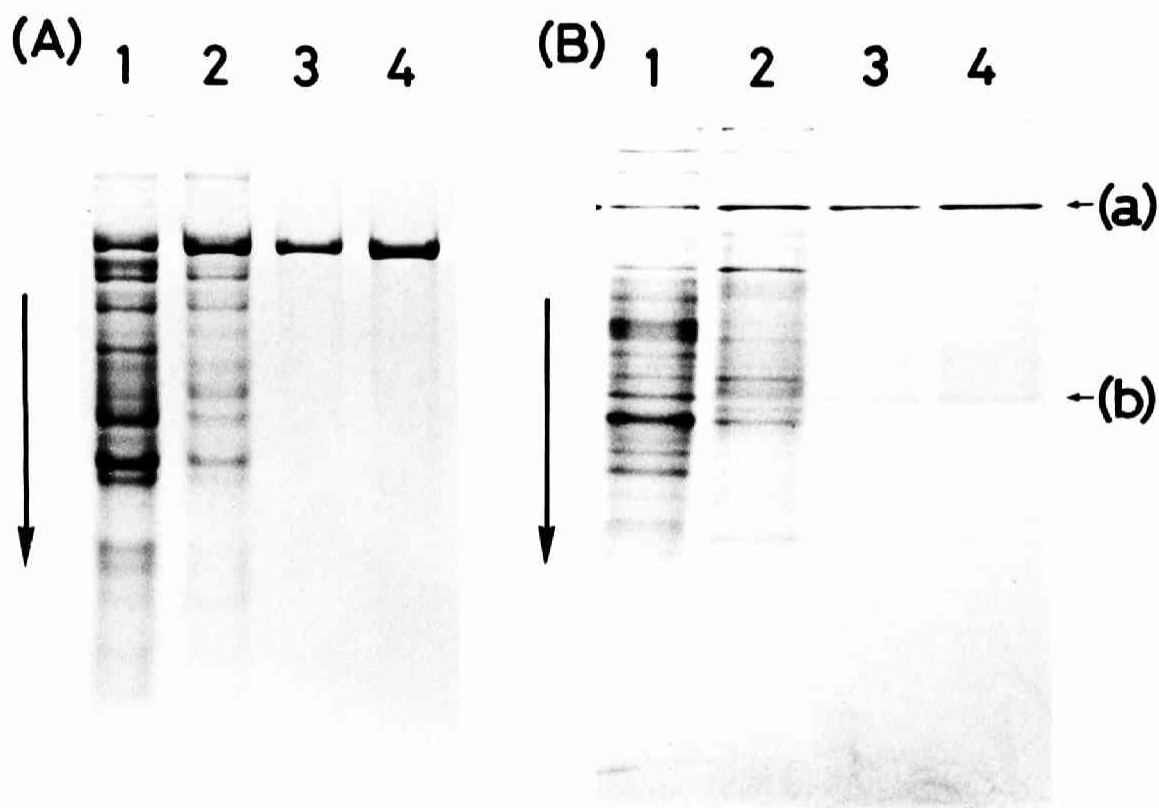


図4. PEP carboxylase の各精製段階における酵素標品の
SDS-ポリアクリルアミドゲル (A) および ポリアクリルアミドゲル
(B) 電気泳動

1. 粗酵素液 (100 μ g タンパク質)、2. 硫酸アンモニウム分画液 (40-52% 飽和、42 μ g タンパク質)、3. Aキシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーのピーク画分 (図3参照、7 μ g タンパク質)、4. 大腸菌 W 株より精製された PEP carboxylase 標品⁷⁴⁾。(B)の矢印(a)および(b)については 本文参照。

結果を表IVにまとめる。また、ここでは各段階における詳しい結果は省略するが、*ppc* をより小さなプラスミド (pS3) にサブクローニングした PCR1/pS3 から酵素精製することにより

表Ⅳ 大腸菌 JA200/pLC20-10 からの PEP carboxylase の精製

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract ^a	505	15,100	31,400	2.08	100
Streptomycin treatment	525	13,900	31,300	2.25	99.8
Ammonium sulfate fractionation (40-52% saturation)	81.0	2,530	22,000	8.70	70.1
Hexyl-Sepharose chromatography	13.8	153	12,900	84.3	41.1

^a 湿重量 137 g の菌体より調製した。

同様の操作によって、湿重量 41.3 g の菌体から 267 mg の電気泳動的に均一な酵素標品を得ることができた。精製に要した期間は、4-5日間であった。

Ⅲ-2. PEP carboxylase の一次構造

(1) N-末端領域のアミノ酸配列

PEP carboxylase の一次構造の化学的分析として、まず最初に N-末端アミノ酸残基の分析を行なった。N-末端アミノ酸残基の決定法としては、Edman 法⁹⁸⁾、ダンシル法⁸³⁾などが現在一般に使用されている。PEP carboxylase の N-末端アミノ酸残基は、以前大腸菌 W 株の酵素について Edman 法によりセリン残基²⁷⁾、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の

酵素についてダンシル法によりメチオニン残基⁷⁹⁾と同定されていた。しかしながら、N-末端アミノ酸残基としてセリン残基をもつタンパク質においては、Edman法を用いて分析を行なった場合、最終的に同定すべきフェニルチオヒダントイン-セリンが不安定であり、その同定が比較的困難であることが知られている。実際、大腸菌W株の酵素のN-末端アミノ酸残基の分析においては、Edman分解の結果得られたフェニルチオヒダントイン-アミノ酸が、TLCにおいて複数のスポットを与えることが報告されている²⁷⁾。そこで、本研究においてはセリン残基も同定することのできるダンシル法を用いてN-末端アミノ酸残基の分析を行なった。ヘキシル-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによって得られた大腸菌K-12株のPEP carboxylase標品について分析を行なった。さらに、比較のため、大腸菌W株の酵素標品⁷⁴⁾についても同時に分析を行なった。それぞれの酵素タンパク質をダンシル化したのち加水分解し、ポリアミドシートを用いてダンシル-アミノ酸を同定した(図5)。両酵素標品は、ともに同じようなパターンのスポットを与え、ダンシルクロリドの分解物であるダンシル酸(DNS-OH)、チロシン残基のOH基とダンシルクロリドとが反応した生成物(O-Tyr)、およびリジン残基側鎖のε-

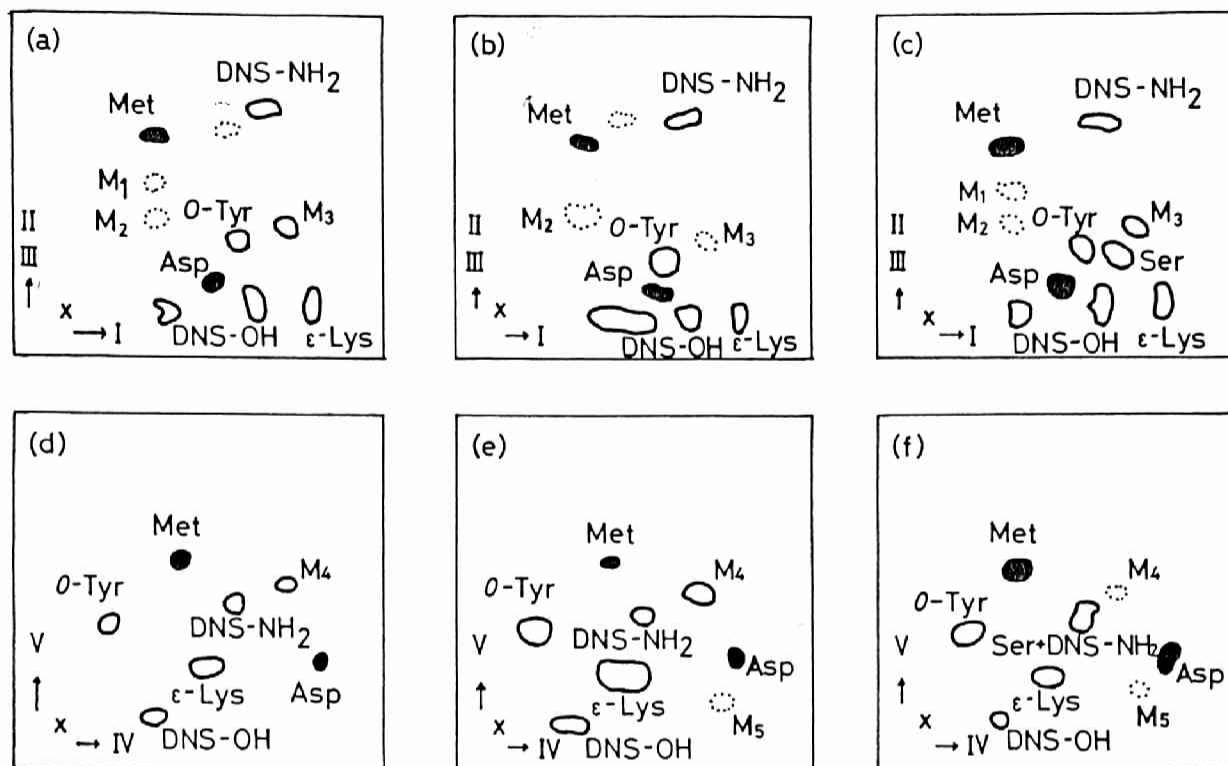


図5 ダンシル法による PEP carboxylase の N-末端アミノ酸残基の分析

大腸菌 JA200/pLC20-10 株 (a), (c), (d), (f) および W 株 (b), (e) から調製した酵素をダンシル化したのち塩酸加水分解した。得られた試料をホリアミド二次元 TLC によって分析した。(c), (f) では試料にさらに ダンシル-メチオニン、ダンシル-アスパラギン酸 および ダンシル-セリンを加えた。M1-M5 は、ダンシル-メチオニンの誘導体のスポットと考えられる。他のスポットについては本文参照。溶媒Ⅰ、1.5% ギ酸水溶液；溶媒Ⅱ、ベンゼン-酢酸 (9:1, v/v)；溶媒Ⅲ、酢酸エチル-メタノール-酢酸 (20:1:1, v/v)；溶媒Ⅳ、濃アンモニア水-水 (1:1, v/v)；溶媒Ⅴ、n-ブタノール-n-ペンタン-ギ酸 (10:10:1, v/v)。

アミノ基とダンシルクロリドとが反応した生成物 (ε-Lys) などのスポットが検出されたが、α-アミノ基とダンシルクロリドとが反応した生成物としては、メチオニン および アスパラギン(酸)

残基の誘導体のスポットが検出された。セリン残基の誘導体のスポットは、W株の酵素標品も含めともに検出されなかった。このように、二つのアミノ酸残基の誘導体が検出された理由として、酵素標品中に低分子量のペプチドあるいはアミノ酸が混在している可能性が考えられた。酵素標品は、ダンシル化を行なう前に、50 mM 炭酸水素アンモニウムに対して外液を数回交換しながら透析を行なうことにより脱塩した。しかし、本酵素の保存時には、安定性を保つためにエフェクターの一つであるL-アスパラギン酸を加えてあったことも考えあわせると、低分子量の化合物が、ダンシル化した酵素試料中に混在していたという可能性は、完全には否定できない。そこで、酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて低分子量の化合物と完全に分離し、泳動後ゲルより抽出した酵素タンパク質についてN-末端アミノ酸残基の分析を行なうことによりこの可能性を検討した。この際、できるだけ収率よくゲルからタンパク質を抽出し、しかも分析に適した試料を調製するために、ゲルはCoomassie brilliant blueでは染色せず、冷却することによりタンパク質バンドを検出した⁸²⁾。このようにして得られた標品に対して、ダンシル法によりN-末端アミノ酸残基を分析したところ、上と同様、 α -アミノ基とダンシル

クロリドとが反応した生成物としては、メチオニンおよびアスパラギン(酸)残基の誘導体が検出された。したがって、低分子量化合物の混在という可能性は否定され、PEP carboxylaseには二種類のポリペプチド鎖が含まれていることが確かめられた。

また、以前、W株の酵素において、N-末端アミノ酸残基がセリン残基であると同定されていたが、これは、二種のポリペプチドが存在したために混乱が生じたものと推定される。

次に、K-12株の PEP carboxylase を気相シーケンサーにかけ、N-末端アミノ酸配列の分析を行なった。その結果、自動 Edman 分解の各段において、二種類のフェニルチオヒダントイン-アミノ酸が遊離されてきた。しかし、この結果は、サブユニットポリペプチドとしてN-末端のプロセシングの度合が異なる二種類の分子種、すなわち、N-末端にメチオニン残基をもつものと、このメチオニン残基が切断され、メチオニン残基を欠いている点でのみ前者とは異なっているものを考えることにより、合理的に解釈することができた(表V)。N-末端にメチオニン残基をもつサブユニットポリペプチドのN-末端アミノ酸配列は、Met-Asn-Glu-Gln-Tyr-X-Ala-Leu-X-Ser-Asn-Val-Ser-Met-Leu-Gly-Lys-Val-Leu-Gly- であると決定された。遺伝子操作によって細胞内の酵素含量を増加させた

表V. PEP carboxylase の自動Edman分解

500 pmol のサブユニットポリペプチドを気相プロテインシーケンサーにかけてアミノ酸配列を分析した。

Cycle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Major sequence	Met	Asn	Glu	Gln	Tyr	(Ser) ^a Ala	Leu	(Arg) ^a Ser		
pmol	314	278	328	171	113	-	129	183	-	NQ ^b
Minor sequence	Asn	Glu	Gln	Tyr	(Ser) ^a Ala	Leu	Arg	Ser	Asn	
pmol	166	144	89	86	-	114	114	NQ ^b	NQ ^b	119

Cycle	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Major sequence	Asn	Val	Ser	Met	Leu	Gly	Lys	Val	Leu	Gly
pmol	180	245	NQ ^b	141	139	157	191	210	179	173
Minor sequence	Val	Ser	Met	Leu	Gly	Lys	Val	Leu	Gly	Glu
pmol	178	NQ ^b	149	105	119	140	158	138	136	101

^a 遺伝子DNAの塩基配列から推定されたものの、検出されなかったアミノ酸残基。

^b 収量が低かったために正確に定量することはできなかった。

場合、一部のポリペプチドのN-末端がホルミル基でブロックされたままになっている例が tryptophan synthase の α -サブユニットについて知られている¹⁰⁰⁾。しかし、この PEP

carboxylase の場合は、第一段の収率が 96 % である (表 V) ことから、N-末端がフロックされている分子種はほとんど存在しないものと考えられる。Edman 分解の結果決定された N-末端 アミノ酸配列は、サブユニット ポリペプチドの N-末端に由来する trypsin 分解ペプチドを調製し、分析することによって確められた。Zabin と Fowler の方法⁸⁹⁾に従って N-末端 trypsin 分解ペプチドを調製し、ダンシル-Edman 法により アミノ酸配列を決定した。得られたペプチドのアミノ酸配列は、Met-Asx-Glx-Glx-Tyr-Ser-Ala-Leu および Asx-Glx-Glx-Tyr-Ser-Ala-Leu であった。

以上の N-末端領域のアミノ酸配列の分析結果は、遺伝子 DNA の塩基配列から推定されたアミノ酸配列⁵²⁾のうち、Met-1 および Asn-2 を N-末端とするものに一致した (図 14 参照)。

(2) C-末端領域のアミノ酸配列

タンパク質の C-末端アミノ酸残基の決定法としては、carboxypeptidase を用いる酵素法が現在一般的によく用いられている⁶⁵⁾。この方法は、タンパク質溶液に carboxypeptidase を加え、遊離されてくるアミノ酸の同定と定量を経時的に

行なうことによって C-末端領域のアミノ酸配列を決定するものである。しかし、PEP carboxylase 溶液に carboxypeptidase A および B を加えて インキュベーションしても アミノ酸は遊離されず、carboxypeptidase Y を用いた場合には endopeptidase 活性⁶⁸⁾ が検出されたため、本研究ではこの方法を用いることができなかった。ここでは、Zabin と Fowler の方法⁸⁹⁾ に従って、サブユニットポリペプチドの C-末端に由来する trypsin 分解ペプチドを単離し、そのアミノ酸配列を分析した。ダンシル法により、得られたペプチドの N-末端アミノ酸残基は、アスパラギンまたはアスパラギン酸であると同定され、消去 Edman 法により、アミノ酸配列は Asx-Thr-Gly であることが示された。このペプチドは、マレイル化した酵素を trypsin で分解することによって生成したので、trypsin 分解前のアミノ酸配列は -Arg-Asx-Thr-Gly であったと考えられる。以上の C-末端領域のアミノ酸配列の分析結果は、遺伝子 DNA の塩基配列から推定された C-末端アミノ酸配列と、全く矛盾なく一致した(図14参照)。

(3) ヒドロキシルアミン処理による Asn-Gly 結合の切断

遺伝子 DNA の塩基配列からは、サブユニットポリペプチド

(Std) (a) (b)

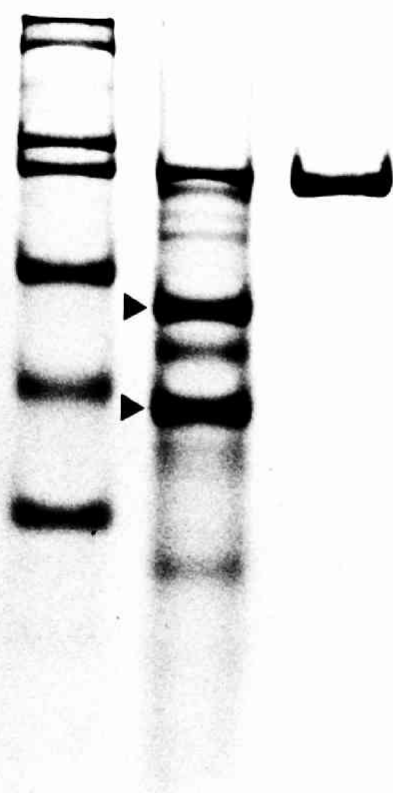


図6. PEP carboxylase のヒドロキシルアミン処理産物の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(a) PEP carboxylase のヒドロキシルアミン処理産物。上下の黒三角は、それぞれ断片 L および断片 S を示す。(b) 未処理の PEP carboxylase。(Std) 標準タンパク質 (Sigma Chemical 社製分子量測定用キット、myosin、 β -galactosidase、phosphorylase b、ウシ血清 albumin、卵白 albumin および carbonic anhydrase を含むもの)。ゲルのアクリルアミドの濃度は 7.5% であった。

中に Asn - Gly 結合がただ一カ所存在することが推定されていた (373 Asn - 374 Gly, 図14 参照)。これを確かめるために、PEP carboxylase をヒドロキシルアミンで処理した。ヒドロキシルアミンは、Asn - Gly 結合を特異的に切断することが知られている⁹⁰⁾。ヒドロキシルアミン処理産物は、SDS-ポリアクリル

アミドゲル電気泳動によって分析した(図6)。この分析では、主に三つのタンパク質のバンドが検出された(a)。分子量の一番大きなタンパク質は、未処理の PEP carboxylase (b) と易動度が同じであり、ヒドロキシルアミンによる切断を受けずに残った⁹⁰⁾ ポリペプチドであると考えられる。図6において黒三角を付けた二つのバンドは、ヒドロキシルアミンによって切断を受けた分解産物と考えられ、それぞれ断片 L (fragment L) および断片 S (fragment S) と名づけた。図6(a)では、その他にもうすいバンドがみられるが、これらは、他のアスパラギン残基の C-末端側のペプチド結合が一部切断された⁹⁰⁾ 結果生成したものと考えられる。断片 L および断片 S の分子量は、この電気泳動によりそれぞれ 60,000 および 42,000 と求められ、遺伝子 DNA の塩基配列から推定された値 56,756 および 42,323 (N-末端にメチオニン残基をもつもの) によく対応していた。断片 L および断片 S をそれぞれゲルから抽出し、N-末端アミノ酸残基 および アミノ酸組成を分析した。断片 S の N-末端アミノ酸残基は、ダンシル法により、メチオニン およびアスパラギン(酸)残基と同定され、未処理の PEP carboxylase (図5 参照) と同様の結果を示した。一方、断片 L の N-

表VI. PEP carboxylase および ヒドロキシルアミン処理
によって得られたペプチド断片のアミノ酸組成

Amino acid	Intact enzyme		Fragment L		Fragment S	
	Protein ^a	DNA sequence ^b	Protein ^c	DNA sequence ^b	Protein ^c	DNA sequence ^b
Aspartic acid	78.4	77	43.2	41	36.4	36
Threonine	39.1 ^d	41	21.6	22	18.5	19
Serine	49.5 ^d	51	26.2	28	21.8	23
Glutamic acid	114.6	117	64.4	62	55.9	55
Proline	46.4	45	27.0	29	17.5	16
Glycine	58.8	56	36.6	39	21.9	17
Alanine	79.7	80	47.1	50	31.7	30
Half-cystine	8.8 ^e	8	ND ^h	5	ND ^h	3
Valine	51.5 ^f	50	27.6	28	21.9	22
Methionine	24.2	24	13.5	15	9.2	9
Isoleucine	43.1 ^f	43	25.7	28	14.0	15
Leucine	118.8	118	61.4	63	50.9	55
Tyrosine	21.9	23	9.8	14	6.6	9
Phenylalanine	18.8	18	10.3	12	6.5	6
Histidine	13.1	13	6.1	6	5.9	7
Lysine	44.6	42	21.0	22	18.1	20
Arginine	59.7	58	31.3	34	22.6	24
Tryptophan	13.6 ^g	19	ND ^h	12	ND ^h	7

^a 減圧下、定沸点塩酸により110°C、24時間、48時間 および72時間加水分解したものそれぞれ2組ずつの分析値より求めた。

^b Fujita ら⁵²⁾ によって報告されたもの。 ^c 減圧下、定沸点塩酸により110°C、24時間加水分解したもの2組の分析値より求めた。

^d 加水分解時間を0時間に外挿して求めた。 ^e 別の試料について過ギ酸酸化¹⁰¹⁾ 後、システイン酸として定量した。

^f 加水分解時間72時間のものの分析値のみから求めた。

^g 別の試料について、4M メタンサルホン酸によって110°C、24時間加水分解することによって求めた¹⁰²⁾。 ^h 未定量。

末端アミノ酸配列は、ダンシル-Edman 法により Gly-Asx-Leu- であると決定され、遺伝子 DNA の塩基配列から推定された配列 373 Asn - 374 Gly - 375 Asp - 376 Leu- とよく対応した。

表 VI に、未処理の PEP carboxylase および断片 L と断片 S のアミノ酸組成の分析結果を、推定値と並べて示した。

これらの分析結果は、推定値とよく一致していた。

(4) DACM で修飾されたシステイン残基を含む trypsin 分解ペプチドのアミノ酸配列

DACM は、SH 基と反応して蛍光性となる試薬であり⁹¹⁾、システイン残基を含むペプチドの標識試薬として用いられている^{92), 103)}。大腸菌の PEP carboxylase には、サブユニットあたり 8 個のシステイン残基があるものと推定されている⁵²⁾。PEP carboxylase は、DACM とインキュベーションすることにより、速やかに、かつ完全に失活した (図 10 参照)。そこで、以下では、本酵素を DACM で修飾し、trypsin 分解後、蛍光標識されたペプチドを単離して、そのアミノ酸配列を決定した。PEP carboxylase の残存活性が 12% になった時点で反応を止め、trypsin 分解後、得られた分解産物を HPLC で分析した。図 7 は、イオン交換カラム (A) および

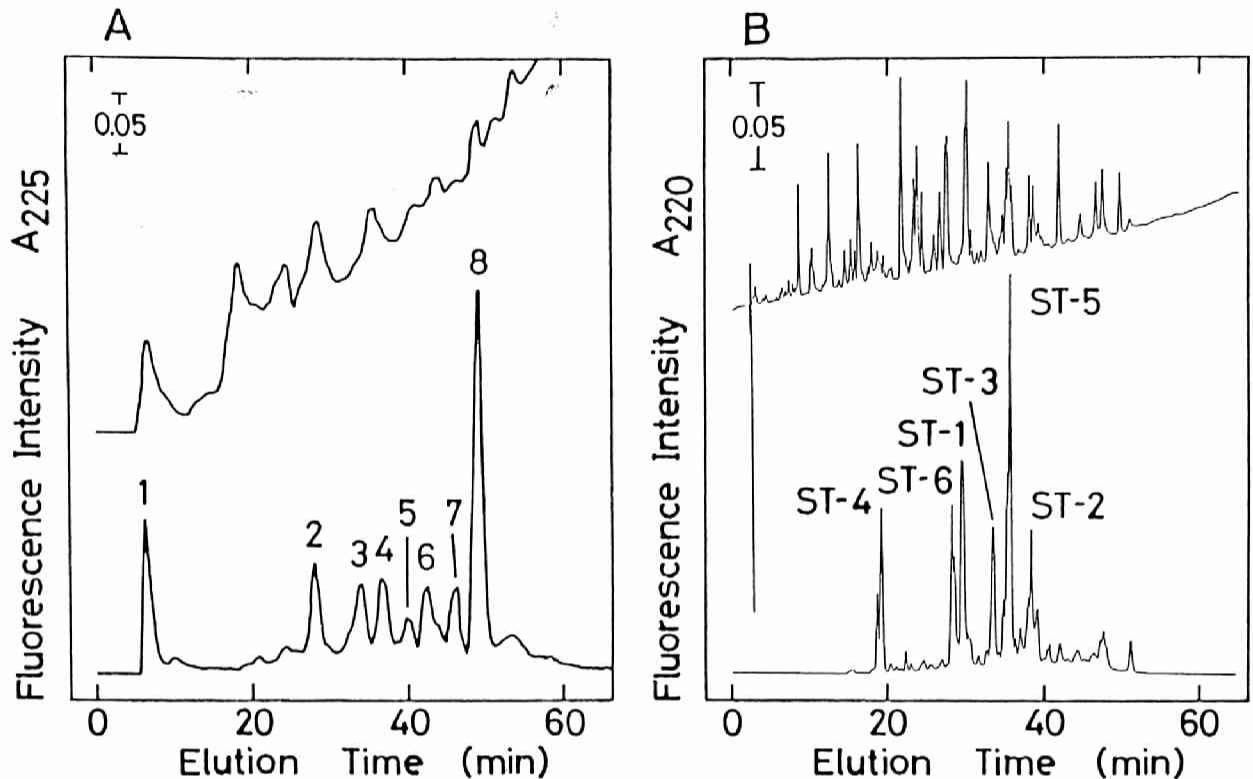


図7. DACMで修飾した PEP carboxylase の trypsin 分解産物の HPLC による分離

約 1 nmol の trypsin 分解産物を、イオン交換 HPLC (A) および トリフルオロ酢酸を含む溶媒系を用いる逆相 HPLC (B) にかけてペプチドを分離した。カラムは、それぞれ、DEAE-5PW および μ Bondapak C₁₈ を用いた。溶出液の紫外吸収 (225 nm (A) または 220 nm (B)) および 蛍光強度を連続して追跡した。

C₁₈ 逆相カラム (B) を用いた分析結果を示す。それぞれ多数の 蛍光ピーク が分離してあらわれた。そこで、これらのカラムにより 蛍光をもつペプチドを単離・精製した。8.8 mg の PEP carboxylase を残存活性 12% になるまで DACM で修飾し、trypsin で分解した。得られた分解産物はまず

イオン交換カラムにかけ、八つの蛍光をもつ画分(図7A、1-8)をそれぞれ分取した。画分2, 3, 4, 5 および 6 は、次にトリフルオロ酢酸を含む溶媒系を用いた逆相HPLCにかけた。これによって、蛍光性のペプチドを単離することができた。それぞれの画分から単離された蛍光性ペプチドを、ST-1、ST-4、ST-6、ST-3 および ST-5 と名づけた。画分1からは、この逆相HPLCのみでは蛍光性ペプチドを単離できなかった。そこでさらに、溶媒系をかえて酢酸アンモニウムを含む溶媒系を用いる逆相HPLCにかけて、蛍光性ペプチドST-2を単離した。また、画分7 および 8 は、逆相HPLCにかけたところ、0-100% アセトニトリルあるいは0-40% (v/v) n-プロパノール の濃度勾配を用いても、蛍光性物質が逆相カラムから溶出しなかった。そこで、0.1M 酢酸アンモニウムを溶媒系とし、東洋曹達工業 TSK G2000 SW カラムを用いるゲル permeation HPLC にかけて。しかし、得られた蛍光性画分を塩酸加水分解後アミノ酸分析計にかけてもアミノ酸は検出されず、これらはペプチドではないことがわかったため、これ以上の分析は行なわなかった。得られた蛍光性ペプチドは、それぞれ塩酸加水分解後、アミノ酸分析を行なった。各ペプチドの

表Ⅶ. DACM で 標 識 され た ヘ プ ロ チ ド の ア ミ ノ 酸 組 成

試料は、減圧下、1% (v/v) 2-メルカプトエタノールを含む 6M 塩酸によって 110°C、24 時間 加水分解した。表の値は、検出されたアミノ酸の相対値(モル比)を、カッコ内の数は、遺伝子 DNA の塩基配列から推定された各アミノ酸残基の数を示す。

Amino acid	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5	ST-6
S-Succinylcysteine	0.8(1)	0.9(1)	0.7(1)	0.9(1)	0.8(1)	0.9(1)
Aspartic acid	1.1(1)		1.2(1)		2.0(2)	
Threonine			0.9(1)	0.9(1)		
Serine			1.0(1)		1.8(2)	1.0(1)
Glutamic acid	0.9(1)		4.0(4)	1.1(1)	1.2(1)	2.9(3)
Proline		1.0(1)	1.0(1)			
Glycine		1.1(1)	1.2(1)			
Alanine	1.2(1)		4.2(4)			1.1(1)
Valine	1.9(2)	2.0(2)	1.8(2)		1.6(2)	
Methionine	0.8(1)				0.8(1)	0.9(1)
Isoleucine			1.9(2)		2.0(2)	
Leucine	1.1(1)	0.9(1)	1.0(1)		0.9(1)	1.0(1)
Tyrosine			1.0(1)		0.9(1)	
Phenylalanine		0.9(1)				
Lysine	0.9(1)			1.0(1)		
Arginine		0.9(1)			0.9(1)	1.1(1)
Yield (nmol) ^a	14.0	8.2	10.0	16.8	17.9	10.8
Residue no.	151-159	385-392	453-472	567-570	656-669	747-755

^a 89 nmol のサブユニットポリヘプロチドを DACM で修飾して各ヘプロチドを得た。

アミノ酸組成を表Ⅶに示す。得られたペプチドの塩酸加水分解物には全て S-スワシニルシステインが含まれ、他の修飾アミノ酸はみられなかった。DACMは、システイン以外のアミノ酸残基とも反応する可能性が考えられたが、S-スワシニルシステインは、DACMで修飾されたシステイン残基を加水分解することにより生成することが知られており¹⁰³⁾、DACMは PEP carboxylase のシステイン残基と反応していたことが確かめられた。遺伝子 DNA の塩基配列からは、PEP carboxylase を trypsin で分解することにより 7 種類のシステイン含有ペプチドが得られるものと予想される。得られた六つのペプチドのうち、ST-3 を除く五つのペプチドのアミノ酸組成は、予想されたものと一致し、それぞれのペプチドの一次構造上の位置を同定することができた。

ST-1	MVEVN [*] ACKL +++++
ST-2	[*] CFGVPLVR ++++
ST-3	EVLDT [*] CQVIAEAPQGSIAAY +++++
ST-4	[*] TCEK ++
ST-5	IMDELSV [*] ISCDVYR +++++
ST-6	QSELEAM [*] CR +++++

図8. DACM で修飾されたシステイン残基を含む trypsin 分解ペプチドのアミノ酸配列

矢印は、タンシル-Edman 法によって配列決定されたアミノ酸残基を示す。他の配列は、ペプチドのアミノ酸組成および遺伝子 DNA の塩基配列から推定した。星印は、DACM で修飾されたシステイン残基を示している。

また、ST-3は、用いた trypsin 標品中の chymotrypsin 様の活性⁶⁵⁾により、Tyr-472 と Val-473 の間のペプチド結合が切断されて生成してきたものと考えれば、そのアミノ酸組成は予想されたものと一致する。ペプチドの一次構造上の位置は、ペプチドの N-末端アミノ酸配列から、さらに確めることができた。ダンシル-Edman 法によって決定したアミノ酸配列(図8)は、推定されたものと完全に一致した。これらの結果は、推定一次構造を確認するものでもある(図14参照)。

Ⅲ-3. 触媒活性に必要なシステイン残基の同定

(1) システイン残基の DACM による修飾の時間経過と 酵素失活との関係

上で単離された六つのペプチドは、逆相HPLCによるペプチドマップの六つの主な蛍光ピーク(図7B)にそれぞれ対応していた。そこで以下の実験では、ペプチドマップ法により、一次構造上それぞれの位置のシステイン残基の修飾の程度を解析した。ただし、それぞれのペプチドは、図7Bに用いた条件下では、肩をもつピークとして溶出した。それぞれのピークの前半の画分と後半の画分のアミノ酸組成

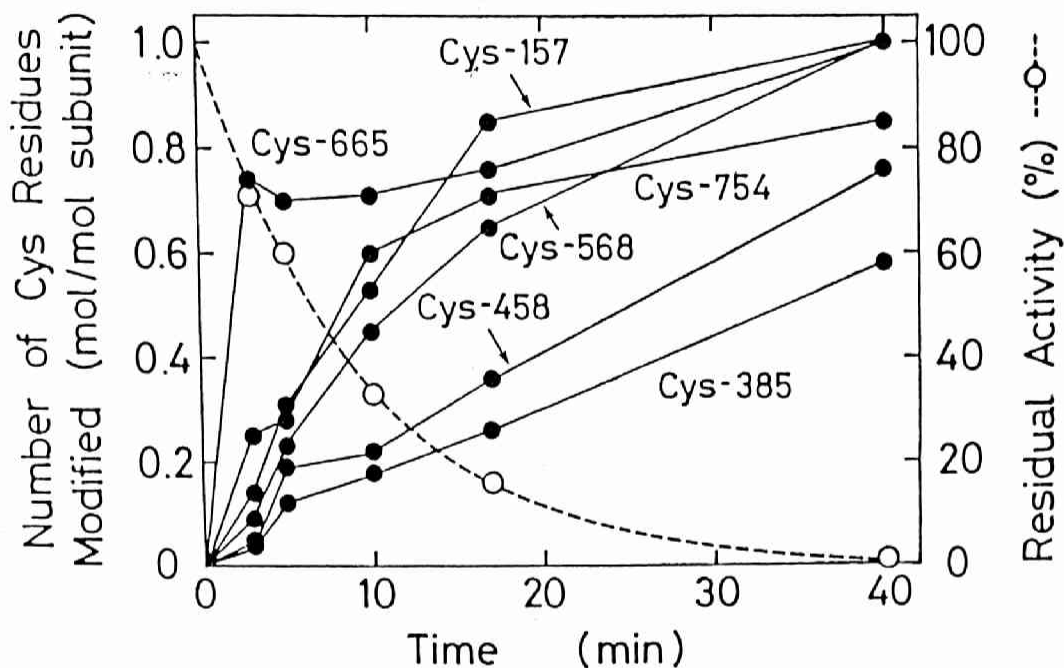


図9. 各システイン残基のDACMによる修飾と酵素失活の時間的経過

0.5 mMのアセチル-CoAを含む3 mlの反応液中で、3 mgのPEP carboxylaseをDACMで修飾した。図に示した時点で、一部(500 μ l)をとりだし、ジチオトレイトールを加えて反応を止めた。酵素の残存活性(○)、および trypsin 分解したのちペフチドマップ法によって各システイン残基のDACMによる修飾の程度(●)を測定した。

は調べた限り同じであり、この現象の理由は現在不明である。そこで、本研究では、対応する蛍光ピークの肩を含めた全面積から蛍光性ペフチドの量を求めた。

酵素をDACMとともにインキュベーションし、適当な時間間隔でその一部をとりだして、酵素の残存活性と各システ

イン残基の修飾の程度を調べた。結果を図9に示す。DACMと反応することが認められた六つのシステイン残基のなかで Cys-665 の反応性が最も高く、酵素の残存活性が71%の時点(修飾時間3分間)で、すでに73%のCys-665が修飾されていた。Cys-157、Cys-568 および Cys-754 の修飾と酵素の触媒活性の消失はほぼ併行して進み、これに対して、Cys-458 および Cys-385 の修飾の程度は酵素の失活に比べて常にかなり低かった。このような各システイン残基の修飾の程度と酵素の失活との対応関係を考えると、Cys-157、Cys-568 および Cys-754 においてよい対応関係が成り立っていると言える。したがって、これら三つのシステイン残基のうちのいずれかの修飾が酵素の失活と直接結びついているものと考えられた。

(2) ホスホ乳酸によって保護されるシステイン残基

本酵素の活性中心またはその近傍に位置するシステイン残基は、基質または基質アナログによって、DACMによる修飾から保護されるものと期待される。ホスホ乳酸は、強い拮抗阻害剤であり、本酵素のN-エチルマレイミドによる失活に対して保護効果を示すことが報告されている^{26), 28)}。今回の

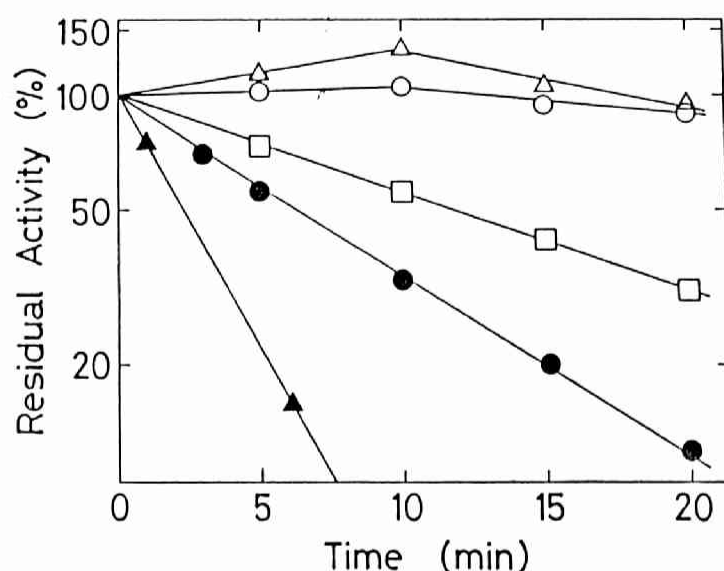


図10. DACMによる酵素失活に対するPEPアナログ
およびアロステリックエフェクターの効果

下に示す添加物を含む500 μ lの反応液中で520 μ gのPEP carboxylaseをDACMで修飾した。図に示した時点で反応液の一部をとりだし、酵素の残存活性を測定した。添加物は、以下の通りである。
(○)、0.5 mM アセチル-CoA および 0.5 mM ホスホ乳酸；(△)、10 mM ホスホ乳酸；(□)、0.5 mM アセチル-CoA および 10 mM グリセロール 2-リン酸；(●)、0.5 mM アセチル-CoA；(▲)、添加物なし。

DACMによる失活に対しても同様に、本酵素はホスホ乳酸によって顕著に保護された。すなわち、図10に示すように、本酵素は、ホスホ乳酸非存在下では速やかにかつ完全に（表VIII参照）失活したが、10 mM ホスホ乳酸存在下では、酵素はまず約1.4倍に活性化され、その後、ホスホ乳酸

表Ⅷ. 各システイン残基の DACM による修飾に対する PEP アナログの保護効果

表に示す添加物存在下に PEP carboxylase を DACM で修飾した。20分間インキュベーションしたのちにジチオトレイトールを加えて反応を止めた。各システイン残基の修飾の程度はペフチドマップ法によって求めた。

Experi- ment No.	Additions	Number of Cys residues modified (mol/mol subunit)						Residual activity (% of native)
		157	385	458	568	665	754	
1.	None	1.01	0.68	0.76	1.00	1.00	0.85	<1
2.	10 mM <u>P</u> -lactate ^b	0.79	0.12	0.21	0.33	0.74	0.69	96 (71% of max. activity) ^a
3.	0.5 mM Acetyl-CoA	0.78	0.26	0.57	0.81	0.81	0.72	6
4.	0.5 mM Acetyl-CoA + 0.5 mM <u>P</u> -lactate ^b	0.19	0.07	0.49	0.16	0.88	0.44	90 (85% of max. activity) ^a
5.	0.5 mM Acetyl-CoA + 10 mM glycerol-2- <u>P</u> ^c	0.72	0.23	0.36	0.58	0.89	0.73	31

^a 図10 および 本文参照。 ^b ホスホ乳酸。 ^c グリセロール 2-リン酸

存在下の約 1/10 の速度でゆっくりと失活した。なお、この条件下では、DACM を加えなかった場合の酵素自身の失活はみられなかった。そこで次に、どの位置のシステイン残基がホスホ乳酸によって保護されるかを調べてみた。まず、10 mM ホスホ乳酸存在下 および 非存在下に、酵素を DACM とともに 20分間インキュベーションし、ペフチドマップ法

によって各システイン残基の修飾の程度を解析した。結果を表Ⅷ(実験1および2)に示す。酵素失活からの保護に対応して、Cys-385、Cys-458 および Cys-568 の修飾がホスホ乳酸によって顕著に保護された。次に、0.5 mM アセチル-CoA を加えて、ホスホ乳酸の保護効果を解析した。アセチル-CoA は、本酵素のアロステリック アクチベーターの一つであり、本酵素の高次構造を変化(allosteric transition)させ、基質 PEP と同様にホスホ乳酸の酵素への親和性も高めることが知られている^{注1}。このため、アセチル-CoA を加えることにより、酵素を異なるコンホメーションの状態(conformational state)に導き²⁸⁾、非常に低濃度のホスホ乳酸によって上と同程度の保護効果が得られるものと期待される。アセチル-CoA は、それ自身によっても酵素失活からの保護効果を示したが、さらに、0.5 mM ホスホ乳酸を加えることにより顕著な保護効果が観察された(図10)。

注1 本酵素のホスホ乳酸に対する K_i 値は、共存するアロステリック アクチベーターの濃度に大きく依存する。例えば、1 mM の PEP に対し、2 mM のホスホ乳酸は、アクチベーター非存在下では有意な阻害効果をほとんど示さないが、0.44 mM アセチル-CoA 存在下では 50 % の阻害を与える。pH 8.5 において、0.44 mM アセチル-CoA 存在下での本酵素の PEP に対する K_m 値およびホスホ乳酸に対する K_i 値は、それぞれ 0.69 mM および 0.90 mM と求められている^{28), 104)}。

この条件下では、Cys-157、Cys-385、Cys-568 および Cys-754 の修飾がホスホ乳酸によって大きな保護を受けた（表Ⅷ、実験3と4）。これに対し、弱い拮抗阻害しか示さない¹⁰⁴⁾ グリセロール 2-リン酸は、アセチル-CoA 存在下 10 mM の濃度でも、酵素失活に対して弱い保護効果しか示さず（図10）、これに対応して Cys-458 および Cys-568 の修飾が弱い保護を受けたのみであった（表Ⅷ、実験5）。

以上、修飾の時間的経過 および ホスホ乳酸の保護効果の解析結果から、修飾の程度と酵素失活の程度との間に常によい対応関係が成り立っていたのは Cys-568 のみであった。このことから、Cys-568 は、本酵素の活性中心もしくはその近傍に位置しているのではないかと推定される。

Ⅲ-4. Anacystis nidulans の PEP carboxylase との一次構造の比較

A. nidulans の PEP carboxylase は、調べた限りではアロステリック エフェクター をもっており⁵⁵⁾、この点で大腸菌酵素とは対照的な酵素である。申請者らの研究室では、A. nidulans の PEP carboxylase の遺伝子のクローニングも達成し、⁵⁶⁾ その DNA 塩基配列を決定した⁵⁷⁾。

```

A. 1  MLAVSLRDHGFPSATVQIRPAFCVQSDVVGSGNPPRMNYCQNARTAMSAALQSSDQAFRTVSSPLATDLDLSSPLEFFLR
      Δ
E. 1  MNEQYSALRSNVSMGLGKVLGETIKDALGEHILE RVETIRKLSKSSRAGNDANRQ
      * * * * *
A. 81  HRLTVVEELWEVVLQECGQELVDILTQLRDLTSPEGQAPEVGGALVQVIETLELSDAIRAARAFALYFQLINIVEQHY
      Δ
E. 55  E LLTT LQN LSNDELLPVARAFSQFLNLANTAE QYHSISPKEAASNPEVIARTLRKLNQPELSEDTIKKAVESLS
      * * * * *
A. 161 EQTQ YQLAYERSRLEPLPGPDESPEGLHTIEIPQHQLDPFAAVIPLNQDPATFQTLFPRLR QLVPPQMIQELTDRLD

E. 131 LELVLTAPTEITRRTLIHKMVEVNACLKQLDNKDIA D Y E HNQLMRR LRQLIAQSWHTDEIRKLRSPVDEAKW
      * * * * *
A. 239 IRLVFTAHPTEIVRHTIRDQRRRIAYLLRQLEDELTGKNGRFRELAQNIROQLTEEIRLWWRTDELHQFKPTVLDDEVY

E. 205 GFAYVENSLWQGVPNYLRELNEQLEENLGKLPVEFVPVRFTSWMGGDRDGNPNVTADITRHVLLSRWKATDLFLKDIO
      * * * * *
A. 319 ALHYFQEVLFEAIPLLYQRFRLALQGTFFDLQPPRYNFCQFGSWVGSDDRGHNSVTSAVTWQTACYQRLVLDRIYITAVE
      Δ

E. 285 VL VSELSM VEATPELLALVGEEGA AEPYRYLMKNLR S RL MA TQAWLE ARKGEELPKP E GLLTQNE
      * * * * *
A. 399 HLRNVLSLSMHWSEVLPELLSSLEQESMLFPETYEQLAVRYRQEPYRLKLSYILERLHNTRDRNTRLQOQKEKDPITPLP

E. 351 ELWE PLY A C Y QSLQACGMGIANG D L LOTLR RVKCFGVPLVRIDIRQESTRHEALGELTRYLGI GD YE
      * * * * *
A. 479 EYRDGTLYQAGTAFLEDKLIQHNKQTLGSCYELEKLCQVEIFGFNLVHLDIRQESSRHSDAINEICEYLQILPPYN
      Δ

E. 420 SWSEADKQAFILRELNSKRPLPRNWQPSAE TREVLDTCQVIAE APQ GSIA AYVISMAKTPSDVLAVHLLKKEAG
      * * * * *
A. 559 ELSEAERTAWLVQELKTRRPLVP ARMPFSESTREIETLRMVKQLQEEFGAACTYIISMSRELSDLLEVLLAKEVG
      Δ

E. 495 I G FAMPVAPLFETLDDLNNANDVMTQLLNIDWYRGL IQGQM VMIGYSDSAKDAGVMAASWAQYQAQDAL
      * * * * *
A. 638 LYDPVTGKSSLQVIPLFETVEDLQNAAPRVMTALFELPFYTQLNPTQSEPLQEVMLGYSDSNKDSGFLSSNWEIHKAKAL

E. 565 IKTCEKAGIELTLFHGRGSGIGRGGAHAALLSQPPGSLKGLRVTEQEGEMIRFKYGLPEITVSSLSLYTGAILANLL
      * * * * *
A. 718 GTVARDHRVKLRIFHGRGSGVGRGGPAYEAILAQPGRTTQGRITQGEVLASKYALPELALYNLETITTAIVIQSSLL

E. 645 PPP EPKESWRRIMDELSVISCDVYRGYVRENKDFVYFRSATPEQELGKLPLGSRPAKRRPTG GVESLRAIPWIFAWT
      * * * * *
A. 798 GSGFDDIEPNQIMEELAARSRRHYRALVYEQPDVDFNQVTPIEEISKLQISSRPARRKTGKRDGLSLRAIPWVFSWT

E. 723 QNRLMLPAWLGAAGTALQKVVEDGKQSELEAM CR D WPFSTRLGMLMVFADKDLWLAEEYDQRLVD KALWPLGKEL
      * * * * *
A. 878 QSRFLLPSWYGVGTALQEFQERPEQNLNLLRYFYEKWPFMRVISKVEMTLAKVDLQIAHHYVHELANPEDQERFERVF

E. 799 RNLQEE DIK VVLAIANDSLHMLADLPWIAESIQLRNIYTDPLNVLQAEEL H RS RQ AEKEG QEPD PRVE QA
      * * * * *
A. 958 SQIAAEFQLTCHLVLTITNHGRLLDGPDLQRSVQLRNGTIVPLGFLQVALLKRLRQYRQQTETTGLMRSRYSKGELLRG
      Δ

E. 868 LMVTIAGIAAGMRNTG
      * * * * *
A. 1038 ALLTINGIAAGMRNTG

```

図11 大腸菌(E. 上列)および *A. nidulans* (A. 下列)のPEP carboxylaseのアミノ酸配列の比較

アミノ酸残基が一致している位置に星印をつけた。空白は、二つの配列を並べるために入れた欠失をあらわす。それぞれの配列中の全てのシステイン残基に黒三角(大腸菌酵素)あるいは白三角(*A. nidulans* 酵素)をつけた(「考察」の項参照)。

しかし、タンパク質化学的には未だ一次構造が確認されていないため、ここでは遺伝子上の open reading frame から求められた配列を用いて、大腸菌酵素と A. nidulans 酵素の一次構造を比較した。図11に二つの PEP carboxylase のアミノ酸配列を並べて比較した。大腸菌酵素のサブユニットポリペプチドの分子量は、99,061 であり、883 アミノ酸残基から成るのに対し、A. nidulans 酵素のサブユニットポリペプチドの分子量は 121,082 と計算され、1053 アミノ酸残基から成るものと推定されている。この二つのポリペプチドを、最も相同性が高くなるように並べるためには、A. nidulans 酵素の N-末端が大腸菌酵素よりも約 100 残基長いものとし、大腸菌酵素により多くの欠失 (gap、A. nidulans 酵素では 3カ所であるのに対し、大腸菌酵素では 56カ所) を入れる必要があった。特に、大腸菌酵素の 286-382 残基目、および 847-866 残基目の領域には多くの欠失を必要とした。図11では、二つの配列の間で 313 アミノ酸残基 (35%) が一致していた。特に、次の領域、133-146、245-260、390-409、422-442、575-601、711-739 および 869-883 残基目 (数字は、大腸菌酵素の残基番号を示す)、では二つの配列の間で相同性が高く、55%

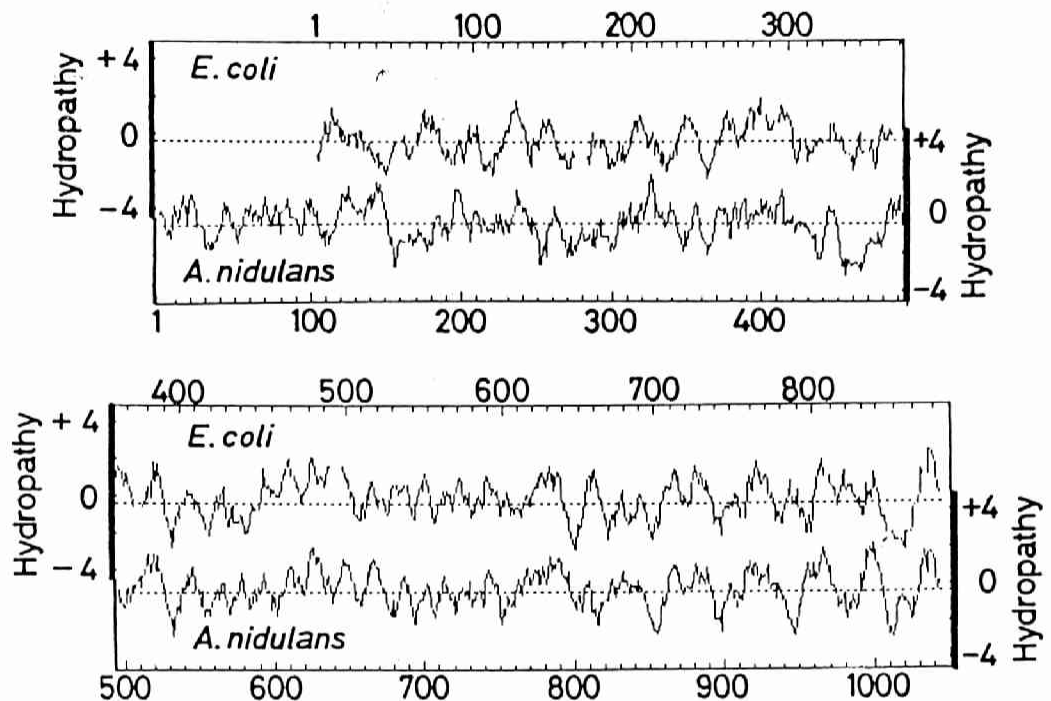


図12. 大腸菌（上段）および *A. nidulans*（下段）の
の PEP carboxylase の「hydropathy profile」の比較

Kyte と Doolittle の方法¹⁰⁵⁾に従い、9残基の断片の「hydropathy」値をN-末端から順に1残基ずつずらして計算し、配列に沿ってプロットした。計算後、図11に従って欠失を入れ、二つの profile を並べた。

以上のアミノ酸残基が一致していた。このような相同性の高い領域は、N-末端側（大腸菌酵素における1-389残基目の領域）にも存在するものの、二つの配列の間の相同性は、明らかにC-末端側（大腸菌酵素の390-883残基目の領域）の方が高かった。二つの配列の間で一致して

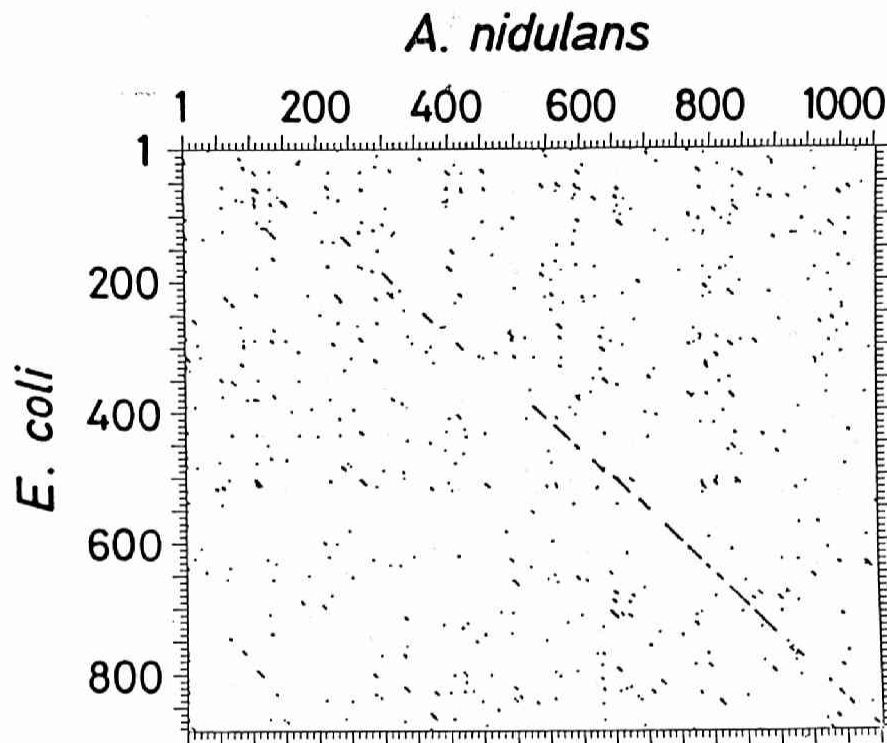


図13. 「dot matrix」法による大腸菌および

A. nidulans の PEP carboxylase のアミノ酸配列上の
の相同領域の検索

それぞれの残基番号で示した位置の配列の間の
相同性を Kubota らの方法⁹⁵⁾に従って定量的
に評価した。ここでは「correlation
coefficient」が 0.45 以上と計算された位置
に点を打った。図の中の斜線は、その位置の
二つの配列の間の相同性が高いことを示して
いる。

いるアミノ酸残基は、N-末端側では 26% であるのに対し、
C-末端側では 43% であった。図12は、Kyte と Doolittle
の方法¹⁰⁵⁾に従って、二つの配列の疎水的および親水的な

性質を計算し、それを並べて比較したものである。この図でも、二つの配列は C-末端側で互いによく似た性質をもっていることが示されている。図13は、Kubota らの方法⁹⁵⁾に従って、アミノ酸の主な性質(大きさ、極性、進化上の変異率など)を考慮に入れて二つの配列を比較したものである。この図でも、C-末端側に相同性が高いことを示す斜線が見出され、大腸菌酵素の 390-739 残基目、A. nidulans 酵素の 528-895 残基目に相当する領域において両者は互いに相同性の高いことが示された。

IV. 考察

タンパク質の構造と機能の関係を解明するためには、タンパク質の高次構造を規定する一次構造に関する知見が必須となる。近年、核酸の構造解析技術が進歩し、遺伝子DNAの塩基配列を比較的短期間で決定し、その配列から翻訳産物であるタンパク質の一次構造を推定することが可能になってきた。しかし、DNAの塩基配列のみでは遺伝子上の翻訳領域を特定できない場合が多く、また、実際に機能しているタンパク質は翻訳後に特定の位置で切断されたり、修飾を受けたりしている場合もある。したがって、タンパク質の構造を決定するためには、DNAの構造解析からの情報のみでは不十分であり、タンパク質そのものの単離と化学的分析が必要となる。本研究では、大腸菌の PEP carboxylase について、遺伝子DNAの塩基配列から導かれたアミノ酸配列のタンパク質化学的な確認を行なうとともに、化学修飾の手法を用いて、活性部位もしくはその近傍に位置すると考えられるシステイン残基の推定を行なった。

IV-1. 均一酵素標品の簡便な調製法の確立

本研究で述べた精製操作により、大腸菌 K-12 株の PEP carboxylase を大量に、かつ簡便に調製することが可能となった。これにより、本酵素のタンパク化学的研究に対する大きな障壁が一つ取り除かれた。本研究では、本酵素遺伝子を組込んだハイブリッドプラスミド保持菌 (JA200/pLC20-10 または PCR1/pS3) から本酵素を調製した。このうち、JA200/pLC20-10 の培養においては、本株の要求アミノ酸以外にもバリンおよびイソロイシンを培地に添加した。これは、この二つのアミノ酸を添加することによって、定常期に達した時の菌体収量が約 1.4 倍大きくなることが予備実験において見出されたからである。さらに、プラスミド保持菌のみを選択的に増殖させるために培地に colicin E1 を加えた。ただし、colicin E1 の添加は、最初の 5 ml の培養のみで実用上十分であった。また、PCR1/pS3 の培養では全ての培地に選択圧としてアンピシリンを加えた。このようにして得られた菌体のフレンチプレスによる破砕液の本酵素比活性は、JA200/pLC20-10 の場合、2.08 単位/mg タンパク質、PCR1/pS3 の場合、5.71 単位/mg タンパク質であり、大腸菌 W 株⁴¹⁾ および B 株⁶⁰⁾ から調製されたもの

について報告された値の約10-30倍であった。JA200/pLC 20-10について、その粗酵素液をホリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、デンストメトリーを行なったところ、この菌体の本酵素含量は、全可溶性タンパク質中の2.2%と求められた。

本精製操作中、最も効果的な段階は、 Δ キシル-Sepharose カラムクロマトグラフィーである(図4 および 表IV 参照)。新たに調製した Δ キシル-Sepharose は、調製する度にその性質が異なり、その都度クロマトグラフィーの条件、すなわち、共存させる硫酸アンモニウムの濃度条件を検討することが必要であった。しかし、一度最適条件を設定すれば、洗浄後0.02%窒化ナトリウム中4°Cに保存したゲルを用いて、以後少なくとも2年間は同じ条件で精製することができた。

今回行なった精製操作では、4-5日間で均一な酵素標品を得ることができた。今後は、X線結晶解析などで大量の酵素標品を必要とする場合、一週間あまりで菌体培養、酵素精製を行ない、グラム単位の均一酵素標品を得ることも不可能ではなくなつたと言えよう。

IV-2. PEP carboxylase の一次構造

PEP carboxylase の酵素タンパク質の構造解析の結果、遺伝子上の翻訳領域を決定し、塩基配列から推定された一次構造を確認することができた。遺伝子の塩基配列からは、同じ読み枠 (reading frame) 上で 39 塩基分離れた二つのメチオニンコドン (Met-1 と Met-14⁵²⁾) がいずれも開始コドンとして考えることが可能であった。PEP carboxylase の酵素タンパク質の N-末端領域のアミノ酸配列を分析した結果、PEP carboxylase のサブユニットポリペプチドは、推定一次構造上の Met-1 および Asn-2 から始まる構造をもつことが明らかとなった。この結果は、PEP carboxylase は Met-1 を開始コドンとして翻訳され、一部の分子種はホルミルメチオニン残基のホルミル基の除去のみを、一部の分子種はさらにメチオニン残基の除去を受けることを示している。このように、N-末端の 1 残基の存否のみが異なる二種のポリペプチドが存在することは、大腸菌酵素では、RNA polymerase β サブユニット¹⁰⁶⁾ EcoRI methylase¹⁰⁷⁾、および sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase¹⁰⁸⁾ などについて報告されている。しかし、N-末端領域におけるこのような多様性 (microheterogeneity)

の生成する原因およびその意義は現在不明であり、今後に残された課題である。ちなみに、翻訳されたペプチドのN-末端メチオニン残基の切断に与る methionine aminopeptidase の特異性は、N-末端メチオニン残基に続くアミノ酸残基の種類によって規定され、Met-Asn 結合は一般に切断されないことが Tsunasawa らによって示唆されている¹⁰⁹⁾。また、本研究においては、本酵素遺伝子を組込んだマルチコピープラスミドをもつ菌体より酵素を調製した。このように、増量した遺伝子から合成されたタンパク質が、染色体遺伝子のみから合成されるタンパク質と分子的に全く同一であるかどうかは問題となる点である。本酵素の場合、N-末端アミノ酸残基については、遺伝子操作技術を全く用いていないW株から調製したものについても全く同様に、二つのアミノ酸が検出された(図5)。したがって、N-末端の多様性は、遺伝子の増量による影響ではないと考えられる。C-末端領域のアミノ酸配列およびヒドロキシルアミン処理によって得られたペプチド断片や DACM で標識された trypsin 分解ペプチドの構造分析の結果と推定一次構造との間にも何ら矛盾点はなく、PEP carboxylase の全一次

MNEQYSALRSNVSMGLKVLGETIKDALGEHILERVETIRKLSKSSRAGNDANRQELLTL +++++	60
QNLSNDELLPVARAFSQFLNLANTAQYHSISPKEGAASNPEVIARTLRKLNQPELSED	120
TIKKAVESLSLELVLTAHPTEITRRTLHKMVEVNA [○] CLKQLDNKDIADYEHNLQMRRLRQ +++++	180
LIAQSWHTDEIRKLRPSPVDEAKWGFVAVVNSLWQGVPNYLRELNEQLEENLGKLPVEF	240
VPVRFTSWMGGDRDGNPNVTADITRHVLLLSRWKATDLFLKDIQVLVSEL [○] SMVEATPELL	300
ALVGEEGAAPYRYLMKNLRSRLMATQAWLEARLKGEELPKPEGLLTQNEELWEPLYA [○] CY	360
QSLQA [○] CGMGIANGDLLDTLRRVK [○] CFGVPLVRIDIRQESTRHTEALGELTRYLGIGDYES +++ +++	420
WSEADKQAFILIRELNSKRPLLPRNWQPSAETREVLDT [○] QVIAEAPQGSIAAYVISMAKTP +++++	480
SDVLAVHLLLKEAGIGFAMPVAPLFETLDDLNNANDVMTQLLNIDWYRGLIQGQMVMIG	540
YSDSAKDAGVMAASWAQYQAQDALIK [▽] TCEKAGIELTLFHGRGGSIGRGGAPAHAAALLSQP + +	600
PGSLKGGRLRVTEQGEMIRFKYGLPEITVSSLSLYTGAILLEANLLPPPEPKESWRRIMDEL +++++	660
SVIS [○] CDVYRGYVRENKDFVPYFRSATPEQELGKLPLGSRPAKRRPTGGVESLRAIPWIFA	720
WTQNRLMLPAWLGAGTALQKVVEDGKQSELEAM [○] RDWPF [○] FSTRLGMLEMVFAKADLWLAE +++++	780
YYDQRLVDKALWPLGKELRNLQEEDIKVVLAIANDSHLMADLPWIAESIQLRNIYTDPLN	840
VLQAE [○] LLHRSRQAEKEGQEPDPRVEQALMV [○] TIAGIAAGMRNTG ++++	883

図14. 大腸菌の PEP carboxylase の全一次構造

本研究で配列を決定した部分は矢印をつけて示した。線で示した領域は、trypsin 分解ポイントと単離し、アミノ酸組成ならびに部分アミノ酸配列を決定することにより確認された配列である。全てのシステイン残基を丸で囲み、Cys-568 には白三角をつけた。黒三角は、ヒドロキシルアミン処理によって切断される Asn-Gly 結合を示している。

構造を確定することができた(図14)。大腸菌の PEP carboxylase (883 残基、分子量 99,061) は、ウサギ筋肉 phosphorylase (841 残基、分子量 97,412)¹¹⁰⁾ 大腸菌 pyruvate dehydrogenase (885 残基、分子量 99,474)¹¹¹⁾ などとともに、全一次構造が明らかにされたアロステリック酵素の中では最も大きなサブユニットポリペプチドをもつものである。

IV-3. PEP carboxylase のシステイン残基

化学修飾の結果から、SH 基は種々の生物種の PEP carboxylase の触媒活性に重要な役割を果たし¹²⁾、必須である²⁶⁾⁻³¹⁾とされていた。本研究では、DACM を標識試薬として、大腸菌の PEP carboxylase の触媒活性に必須なシステイン残基の一次構造上の位置の同定を試みた。本酵素のような炭酸固定酵素では、ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase について、化学修飾や遺伝子操作の手法を用いた機能部位の解析が行なわれている(文献 112-115 参照)。しかし、本酵素では、詳しい解析は全く行なわれていなかった。大腸菌の PEP carboxylase のサブユニットポリペプチド上には 8 個のシステイン残基がある。これらのシステイン

残基は S-S 結合をつくらずに、いずれも SH 基をもっているものと考えられる²⁷⁾。DACM は、このうちの少なくとも六カ所のシステイン残基と反応し、それらを含む蛍光性ハフチドを得ることができた。一方、残り二カ所のシステイン残基 (Cys-359 および Cys-366) は、ここで用いた条件下では DACM とほとんど反応しないものと考えられる。DACM によって残存活性 12% にまで活性を失った酵素を塩酸加水分解し、アミノ酸分析を行なったところ、システイン残基と DACM との反応生成物は、サブユニットあたり 5.1 個しか検出されなかった。Cys-359 および Cys-366 は分子内部に埋め込まれているのかもしれない。

一般に、同じような性質、反応性をもつアミノ酸残基の中から、必須アミノ酸残基を同定する場合に、基質アナログ存在下および非存在下に修飾を行ない、二つの結果を比べて基質アナログによって保護されるアミノ酸残基を検索する方法がある。本研究では、PEP アナログであるホスホ乳酸が酵素失活からの顕著な保護効果を示し、それにともなって、システイン残基の修飾が保護された。しかし、ホスホ乳酸によって修飾から保護されるシステイン残基の位置は一カ所にとどまらず、常に複数のシステイン

残基がホスホ乳酸による保護を受けた。したがって、示差修飾の結果のみから、必須システイン残基について明確な結論を得ることはできなかった。本酵素は、基質アナログやエフェクターの結合によって複雑な高次構造変化を起すことが示されている²⁸⁾。そこで、ホスホ乳酸が活性部位に結合することによって、活性部位から離れた領域までもが構造変化を受け、結果的に活性部位から離れた位置にあるシステイン残基の反応性も変化した可能性が考えられる。しかし、少なくとも、活性部位もしくはその近傍に位置するシステイン残基では、修飾の程度と酵素活性の消失の間に常に対応関係がみられるはずである。この対応関係が、時間的経過も含めて常に成り立っていたのは、Cys-568のみであった。ただし、表Ⅷ、実験2および4では、Cys-568の修飾と酵素失活との対応関係も見かけ上失われている。すなわち、実験2および4では、それぞれ33%および16%のCys-568が修飾されているにもかかわらず、酵素の触媒活性は、修飾前の酵素の4%および10%しか失われていなかった。しかし、この不一致は、ホスホ乳酸存在下に酵素を修飾した場合、酵素は一時的に活性化される(図10)ことを考慮すれば、合理

的に解釈することが出来る。すなわち、表Ⅷ 実験 2 および 4 では、反応を止めた時点で、最大活性化時の 29% および 15% の活性が失われており、Cys-568 の修飾の程度とよく対応している。以上の結果から、DACM と反応する六カ所のシステイン残基のうち、Cys-568 は活性部位もしくはその近傍にあるものと推定される。しかし、(i) Cys-568 の反応性は他の位置のシステイン残基の反応性に比べて際立って高くはないために、Cys-568 のみを特異的に修飾することはできていないこと、(ii) DACM とシステイン残基との反応生成物が比較的に高いために、修飾による酵素の高次構造の変動は不可避であること、(iii) 後で述べるように、*A. nidulans* の酵素では一次構造上対応する位置にシステイン残基はないことから、Cys-568 が大腸菌の PEP carboxylase の触媒反応に直接関与しているかどうかに関してもさらに検討が必要であろう。特定のアミノ酸残基の機能の解析においては、近年、遺伝子操作を用いる手法（いわゆる site-directed mutagenesis）¹¹⁶⁾ が有用となってきた。この手法を用いれば、S 原子を O 原子（システイン残基をセリン残基）に変換して解析することも可能である。大腸菌の PEP carboxylase においては、遺伝子の全塩基

配列が決定され、しかも本研究によって対象となるアミノ酸残基の位置を特定することができたため、この手法を用いた解析が可能となった。本研究は、PEP carboxylaseの活性部位のアミノ酸残基の一次構造上の位置およびその周辺の一次構造を初めて示唆するものである。

IV-4. 他の生物種の PEP carboxylase および他の酵素・タンパク質との一次構造の比較

大腸菌の PEP carboxylase のアミノ酸配列を A. nidulans 酵素の推定アミノ酸配列と並べて比較した。その結果、全体では 35% のアミノ酸残基が両者に一致していたが、相同性の程度は、N-末端側 (26%) よりも C-末端側 (43%) で高いことが見出された。この傾向は、高次構造をも考慮に入れて二つの配列を比べることによって、より一層明らかとなった (図12 および 図13)。このような相同性の程度の違いから、PEP carboxylase は二つの異なる領域、すなわち、C-末端側の進化上保存性の高い領域と N-末端側の変異を受け入れやすい領域とから成る可能性が考えられる。大腸菌酵素は 5 種類ものエフェクターによって複雑な活性調節を受けるアロステ

リック酵素であるのに対して A. nidulans の酵素は エフェクターをもたない (表I 参照)。このような二つの酵素の性質の違いを考えると、PEP carboxylase においては C-末端側の領域が活性中心を形成し、アロステリックな調節機能は主に N-末端側の領域に担われているのではないかと推定できる。大腸菌酵素の Cys-568 が活性部位もしくはその近傍に存在することを示す結果もこの推定と矛盾しない。申請者らの研究室では、大腸菌内で活性をもつ トウモロコシ (Zea mays) の PEP carboxylase の cDNA をクローニングし⁵⁸⁾、その塩基配列から トウモロコシ酵素のアミノ酸配列を推定した⁵⁹⁾。トウモロコシの酵素は、アロステリックな調節を受けるが、そのエフェクターは大腸菌酵素とは異なっている (表I 参照)。このトウモロコシ酵素との比較でも、C-末端側の相同性は N-末端側よりも高くなっていた。さらに、アミノ酸配列を比較すると、サブユニットポリペプチドの C-末端 10 残基の配列が、進化上非常によく保存されていることが注目される (図11 参照)。申請者らの研究室では、以前、大腸菌酵素の C-末端の 21 残基を遺伝子操作によって他のアミノ酸配列に置換すると、細胞内の本酵素活性が検出できなくなる

ことを観察した⁵¹⁾。このことも考え合わせると、PEP carboxylase の C-末端部分は、酵素の触媒活性発現または細胞内での安定性に重要な寄与をしていることが推測される。

一方、これまで、化学修飾の手法を用いて、PEP carboxylase の触媒活性には、システイン、ヒスチジン、リジンおよびアルギニン残基が必須であることが報告されてきた。これらのアミノ酸残基のうち、ヒスチジン残基は三カ所、リジン残基は六カ所、およびアルギニン残基は 23 カ所で大腸菌酵素と *A. nidulans* 酵素の二つの配列に一致していた。なかでも、三カ所のヒスチジン残基（大腸菌酵素の His-138、His-402 および His-579）においては、前後のアミノ酸配列の相同性も高く、トウモロコシ酵素にも対応する位置にヒスチジン残基が見出される。したがって、これらのヒスチジン残基のうちのいずれかが PEP carboxylase の触媒活性の発現に関与している可能性が高い。これに対して、システイン残基の位置は、大腸菌酵素の Cys-568 も含め、二つの配列の間で全く対応していなかった(図11)。このように、システイン残基の一次構造上の位置が、進化上全く保存されていなかったことから、システイン残基が触媒活性に重要な

役割を担っている可能性は低いものと考えられる。システイン残基は、触媒活性には直接関与していないのかもしれない。

次に、大腸菌の PEP carboxylase のアミノ酸配列を、シーケンスバンク（「PROSEQ」）に収録されている他の酵素・タンパク質のアミノ酸配列と比較した。シーケンスバンクは、3100 種類のタンパク質、合計 60 万残基のアミノ酸配列を収録したものを用了。ここでは、まず、Kubota らの方法⁹⁵⁾に従って、PEP carboxylase と各タンパク質のアミノ配列の「correlation coefficient」を計算をした。そして、次に 8 残基以上の長さにおいて 0.40 以上の値を与えた酵素・タンパク質を、PEP carboxylase の一次構造に沿って検索した（図 13 参照）。その結果、PEP carboxylase の一次構造上ほぼ全ての領域に対して多くの酵素・タンパク質がコンピュータによって拾い出されてきた。しかし、大腸菌 PEP carboxylase のある特定の領域（578-591 残基目）に対しては、「correlation coefficient」0.40 以上の値を与える酵素・タンパク質が全くなく、この領域は PEP carboxylase にユニークな構造をもつことが見出された。大腸菌の PEP carboxylase の 578-591 残基目の配列を、A. nidulans 酵素 および トウモロコシ酵素の対応する領域の配列と

<u>E. coli</u>	578	Phe	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Gly	Gly	Ala	Pro	591
		*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*		*	
<u>A. nidulans</u>		Phe	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Pro	
		*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	
<u>Z. mays</u>		Phe	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Pro	

図15. PEP carboxylase に特徴的な配列

他の酵素・タンパク質にはみられない大腸菌の PEP carboxylase にユニークな構造をもつ領域 (578-591 残基目) のアミノ酸配列を、A. nidulans 酵素およびトウモロコシ (Z. mays) 酵素の対応する領域のアミノ酸配列と並べて示した。上下の配列の間でアミノ酸残基が一致している位置には星印を打った。

並べて 図15 に示す。他の酵素・タンパク質ではみられないこの領域の配列が、三つの生物種の PEP carboxylase の間では高度に保存されていた。したがって、この領域は PEP carboxylase に特徴的なものであり、しかも重要な機能を担っている可能性が考えられる。この領域には、Gly-Arg-Gly-Gly という配列がくり返しあらわれ、グリシン残基が多く含まれている。このため、この領域は柔軟な構造をしているものと考えられる。さらに、次に述べる点を考え合わせると、この領域は、基質である PEP のリン酸基との結合に関与している可能性が考えられる。すなわち、この領域には、リン酸基と結合できる塩基性の

ヒスチジン残基、アルギニン残基があり、その前後のアミノ酸配列が進化上極めてよく保存されている。また、一般に、リン酸基は、タンパク質のなかの柔軟で曲がりやすいループに結合する¹¹⁸⁾とされ、PEP carboxylaseのこの領域の二次構造は折り返し構造が予測されている⁵²⁾。最近、ヌクレオチドをリガンドとするタンパク質に共通して見出され、(ピロ)リン酸との結合に関与すると考えられる配列が Möller と Amons によって示された¹¹⁹⁾。彼らは、この配列を「リン酸結合配列 (phosphate-binding sequence)」と呼んでいる。PEP carboxylaseに見出された特徴的な配列は、「リン酸結合配列」、たとえば nitrogenase Fe-protein に存在する次の配列¹²⁰⁾

-Ala-Phe-Tyr-Gly-Lys-Gly-Gly-Ile-Gly-Lys-Ser-Thr-
と、塩基性残基の位置や構造の柔軟性という点で類似の性質をもっている。また、大腸菌の PEP carboxylase において、活性部位もしくはその近傍に位置するものと推定された Cys-568 は、Phe-578 から 10 残基しか離れていない。以上の点から、PEP carboxylase に特徴的な領域の担う機能を考察することができ、遺伝子操作の手法を用いれば、この領域のみ(たとえばヒスチジン残基)に変異を導入

することが可能である。このような変異酵素が触媒活性を失なっていれば、この領域が PEP との結合に関与している可能性は極めて高いと言える。

本研究では、アロステリックな性質の異なる PEP carboxylase の一次構造の比較により、PEP carboxylase の機能部位の一次構造上の位置を考察した。今後は、この種の知見が蓄積されることにより、比較生化学的にも解析がすすみ、アロステリック酵素の構造と機能の対応関係やその進化についても理解を深めることができるものと期待される。

要約

PEP carboxylase の分子構造と機能に関して研究を行い、以下に述べるような知見を得た。

(1) 大腸菌 酵素の簡便な精製法を確立した。本酵素遺伝子を組込んだ“マルチコピー プラスミド”をもつ大腸菌株から酵素を調製し、本酵素を特異的に溶出させる疎水性クロマトグラフィーを行なうことにより、3段階の操作、4-5日の期間で均一な酵素標品を得ることができた。しかも菌体あたりの収量は、従来の精製法の40倍以上であった。この精製法の確立により、タンパク化学的研究に供するための均一酵素標品を、迅速に調製できるようになった。

(2) 遺伝子DNAの塩基配列から推定された大腸菌 PEP carboxylase のアミノ酸配列をタンパク化学的に確認した。さらに、触媒活性に必要なシステイン残基を推定した。

自動Edman法により、サブユニットポリペプチドのN-末端21残基までのアミノ酸配列を決定した。遺伝子DNAの塩基配列からは、二つのメチオニンコドン (Met-1 と Met-14) が開始コドンの候補と考えられた。得られた分析結果は、このうちのMet-1 から始まる配列に一致した。また、C-末端 trypsin 分解 ペプチドを単離してそのアミノ酸配列を決定

した。両末端アミノ酸配列から、遺伝子上の翻訳領域（2,649塩基対）を確定することができた。本酵素を、Asn-Gly結合を特異的に切断するヒドロキシルアミンで処理したところ、二つのペプチド断片、L（分子量60,000）とS（分子量42,000）とが得られた。二つのペプチド断片のN-末端アミノ酸配列およびアミノ酸組成を分析した結果、断片LがサブユニットポリペプチドのC-末端側に、断片SがN-末端側に由来することがわかった。この結果は、Asn-Gly結合が、塩基配列から予想（³⁷³Asn - ³⁷⁴Gly）された通り、ポリペプチドの中央付近に一か所存在することを示している。次に、本酵素のシステイン残基をDACMを用いて修飾し、失活した酵素のtrypsin分解物のなかで 蛍光をもつペプチドをHPLCを用いて単離・精製した。その結果、六つのペプチドが得られ、それらのアミノ酸組成および部分アミノ酸配列を決定した。ペプチドの分析結果は、推定一次構造と全く矛盾なく対応し、得られたペプチドは、それぞれ、Cys-157、Cys-385、Cys-458、Cys-568、Cys-665 および Cys-754を含むものであった。これらのシステイン残基の修飾の時間経過や、ホスホ乳酸による保護効果を調べた結果、活性部位もしくはその近傍に位置するシステイン残基として

Cys-568 が推定された。

(3) 大腸菌の PEP carboxylase の一次構造を、A. nidulans の PEP carboxylase の推定一次構造と並べ、コンピュータを用いて比較した。その結果、全体として 35% の相同性がみられた。相同性の程度は、C-末端側半分が高く、PEP carboxylase の触媒部位はおもに C-末端側に存在するのではないかと推測された。一方、アロステリックな調節機能は、主に N-末端側の領域に担われているのかもしれない。また、従来触媒活性に必須とされていたアミノ酸残基のうち、ヒスチジン残基は三カ所で保存されていたが、システイン残基は全く保存されていなかった。次に、データベースを用いて大腸菌酵素の配列を他の酵素やタンパク質の配列と比較した。その結果、他の酵素・タンパク質にはみられない、PEP carboxylase に特徴的な配列を見出した。PEP carboxylase に特徴的なこの領域は、基質 PEP との結合に関与している可能性が考えられた。この領域の配列は、

⁵⁷⁸ Phe - His - Gly - Arg - Gly - Gly - Ser - Ile - Gly - Arg - Gly - Gly -
Ala - Pro ⁵⁹¹

である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導いただきました香月裕彦教授（現在近畿大学教養部、京都大学名誉教授）ならびに泉井桂博士に深く感謝致します。タンパク質のアミノ酸配列の比較に関して御指導いただきました京都大学化学研究所の大井龍夫教授、西川建博士ならびに金沢大学医療技術短期大学部の中島広志博士に感謝致します。アミノ酸分析ならびにペプチドのHPLCに関して御指導、御協力いただきました当化学教室の山本文子博士、湯元昇博士（現在新技術開発事業団）、京都大学食糧科学研究所の林力丸助教授に感謝致します。アミノ酸およびその誘導体の分析に関して御指導、御助言をいただきました大阪大学蛋白質研究所の油谷克英博士、網沢進博士、東京都立大学理学部の奥山典生教授、磯辺俊明博士に感謝致します。気相プロテインシーケンサーによるアミノ酸配列の分析にあたり御協力いただきました住友化学宝塚総合研究所の藪崎義康博士ならびに大川秀郎博士に感謝致します。また、数々の御指導、御助言をいただきました当化学教室の加治有恒教授、徳重正信助教授、西野徳三博士をはじめ、生物化学研究室の方々に深く

No. 86

Date . . .

感謝致します。

文献

1. Umbarger, H. E. (1956) *Science* 123, 848
2. "Selected Papers in Biochemistry, Vol. 8, Allosteric Regulation" (Tokushige, M., ed.) (1971) Univ. of Tokyo Press, Tokyo
3. Jacobson, G. R. & Stark, G. R. (1973) in "The Enzymes" (Boyer, P. D., ed.) Vol. 9, 3rd Ed., pp. 225-308, Academic Press, Inc., New York and London
4. Crick, F. (1979) *Science* 204, 264-271
5. Sols, A. (1981) in "Current Topics in Cellular Regulation" (Horecker, B. L. & Stadtman, E. R., eds.) Vol. 19, pp. 77-101, Academic Press, Inc., New York and London
6. Engel, P. C. (1973) *Nature* 241, 118-120
7. Nyunoya, H. & Lusty, C. J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4629-4633
8. Ferrara, P., Duchange, N., Zakin, M. M., & Cohen, G. N. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 3019-3023
9. Poorman, R. A., Randolph, A., Kemp, R. G., & Heinrikson, R. L. (1984) *Nature* 309, 467-469
10. Lipscomb, W. N. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 17-34
11. Utter, M. F. & Kolenbrander, H. M. (1972) in "The Enzymes" (Boyer, P. D., ed.) Vol. 6, 3rd Ed., pp. 117-168, Academic Press, Inc., New York and London
12. O'Leary, M. H. (1982) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 297-315
13. Theodore, T. S. & Englesberg, E. (1964) *J. Bacteriol.* 88, 946-955
14. Kortschak, H. P., Hartt, C. E., & Burr, G. O. (1965) *Plant Physiol.* 40, 209-213
15. Hatch, M. D. & Slack, C. R. (1970) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21, 141-162
16. Osmond, C. B. (1978) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 379-414
17. Nasyrov, Y. S. (1978) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 215-237
18. Canovas, J. L. & Kornberg, H. L. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 96, 169-172
19. Nishikido, T., Izui, K., Iwatani, A., Katsuki, H., & Tanaka, S. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 94-99

20. Sanwal, B. D. & Maeba, P. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 194-199
21. Maruyama, H., Easterday, R. L., Chang, H.-C., & Lane, M. D. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2405-2412
22. O'Leary, M. H., Rife, J. E., & Slater, J. D. (1981) *Biochemistry* 20, 7308-7314
23. Hansen, D. E. & Knowles, J. R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14795-14798
24. Fujita, N., Izui, K., Nishino, T., & Katsuki, H. (1984) *Biochemistry* 23, 1774-1779
25. 田口正明, 香月裕彦 (1977) 蛋白質 核酸 酵素 22, 1712-1715
26. Teraoka, H., Naito, S., Izui, K., & Katsuki, H. (1972) *J. Biochem.* 71, 157-160
27. Yoshinaga, T., Teraoka, H., Izui, K., & Katsuki, H. (1974) *J. Biochem.* 75, 913-924
28. Teraoka, H., Izui, K., & Katsuki, H. (1974) *Biochemistry* 13, 5121-5128
29. Kameshita, I., Tokushige, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1979) *J. Biochem.* 86, 1251-1257
30. Manetas, Y. & Gavalas, N. A. (1982) *Photosynthetica* 16, 59-66
31. Raghavendra, A. S. & Vallejos, R. H. (1982) *Indian. J. Exp. Biol.* 20, 619-622
32. Teraoka, H., Izui, K., & Katsuki, H. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 821-827
33. Iglesias, A. A. & Andreo, C. S. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 749, 9-17
34. Kameshita, I., Tokushige, M., & Katsuki, H. (1978) *J. Biochem.* 84, 795-803
35. Iglesias, A. A., Gonzalez, D. H., & Andreo, C. S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 788, 41-47
36. Naide, A., Izui, K., Yoshinaga, T., & Katsuki, H. (1979) *J. Biochem.* 85, 423-432
37. Nishikido, T., Izui, K., Iwatani, A., Katsuki, H., & Tanaka, S. (1968) *J. Biochem.* 63, 532-541
38. Izui, K., Nishikido, T., Ishihara, K., & Katsuki, H. (1970) *J. Biochem.* 68, 215-226

39. Izui, K., Yoshinaga, T., Morikawa, M., & Katsuki, H. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 949-956
40. Taguchi, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1977) *FEBS Lett.* 77, 270-272
41. Yoshinaga, T., Izui, K., & Katsuki, H. (1970) *J. Biochem.* 68, 747-750
42. Izui, K. (1970) *J. Biochem.* 68, 227-238
43. Izui, K., Taguchi, M., Morikawa, M., & Katsuki, H. (1981) *J. Biochem.* 90, 1321-1331
44. Kameshita, I., Tokushige, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 905-909
45. Morikawa, M., Izui, K., Taguchi, M., & Katsuki, H. (1980) *J. Biochem.* 87, 441-449
46. Morikawa, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 689-694
47. Morikawa, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1977) *J. Biochem.* 81, 1473-1485
48. Kameshita, I., Izui, K., & Katsuki, H. (1979) *J. Biochem.* 86, 1-10
49. Yoshinaga, T. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 452, 566-579
50. Izui, K., Sabe, H., & Katsuki, H. (1981) *FEBS Lett.* 133, 311-315
51. Sabe, H., Miwa, T., Kodaki, T., Izui, K., Hiraga, S., & Katsuki, H. (1984) *Gene* 31, 279-283
52. Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K., & Katsuki, H. (1984) *J. Biochem.* 95, 909-916
53. Izui, K., Miwa, T., Kajitani, M., Fujita, N., Sabe, H., Ishihama, A., & Katsuki, H. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 59-71
54. 栗山正人, 泉井桂, 香月裕彦 (1983) *生化学* 55, 793
55. 平井圭介, 栗山正人, 村田卓也, 小滝努, 片桐文章, 泉井桂, 香月裕彦 (1984) *生化学* 56, 611
56. Kodaki, T., Katagiri, F., Asano, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1985) *J. Biochem.* 97, 533-539
57. Katagiri, F., Kodaki, T., Fujita, N., Izui, K., & Katsuki, H. (1985) *Gene* 38, 265-269
58. 山口泰範, 重足勝哉, 泉井桂, 香月裕彦, 杉山達夫 (1985) *生化学* 57, 1071

59. 石鳥純男, 片桐文章, 山口泰範, 重定勝哉, 村田卓也, 泉井桂, 香月裕彦
(1985) 生化学 57, 1072
60. Smith, T. E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4234-4241
61. Clark, V. M. & Kirby, A. J. (1963) Biochim. Biophys. Acta 78, 732
62. Wagner-Jauregg, T. (1935) Ber. Deut. Chem. Ges. B68, 670-673
63. Koenig, R. A. & Johnson, C. R. (1942) Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 155-156
64. Simon, E. J. & Shemin, D. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 2520
65. Allen, G. (1981) "Sequencing of Proteins and Peptides" Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
66. Schwartz, S. A. & Helinski, D. R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6318-6327
67. Wang, S.-S. & Carpenter, F. H. (1965) J. Biol. Chem. 240, 1619-1625
68. Lee, H.-M. & Riordan, J. F. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1135-1142
69. Clarke, L. & Carbon, J. (1976) Cell 9, 91-99
70. Roth, J. R. (1970) Methods Enzymol. 17, 3-35
71. Anraku, Y. (1967) J. Biol. Chem. 242, 793-800
72. March, S., Parikh, I., & Cuatrecasas, P. (1974) Anal. Biochem. 60, 149-152
73. Shaltiel, S. (1984) Methods Enzymol. 104, 69-96
74. Izui, K., Fujita, N., & Katsuki, H. (1982) J. Biochem. 92, 423-432
75. Axen, R. & Ernback, S. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 351-360
76. Yon, R. J. & Simmonds, R. J. (1975) Biochem. J. 151, 281-290
77. Katsuki, H., Nishikido, T., Izui, K., Iwatani, A., & Tanaka, S. (1967) Proc. 7th Int. Congr. Biochem. (Tokyo), pp. 843
78. Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254
79. Davis, B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427
80. Weber, K. & Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
81. Weber, K. & Osborn M. (1975) in "The Proteins" (Neurath, H. & Hill, R. L. eds.) Vol. 1, pp. 179-223, Academic Press, Inc., New York and London
82. Wallance, R. W., Yu, P. H., Dieckert, J. P., & Dieckert, J. W. (1974) Anal. Biochem. 61, 86-92
83. Gray, W. R. (1972) Methods Enzymol. 25, 121-138
84. Woods, K. R. & Wang, K.-T. (1967) Biochim. Biophys. Acta 133, 369-370

85. Zimmerman, C. L., Appella, E., & Pisano, J. J. (1977) *Anal. Biochem.* 77, 569-573
86. Weiner, A. M., Platt, T., & Weber, K. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3242-3251
87. Gray, W. R. (1972) *Methods Enzymol.* 25, 333-344
88. Konigsberg, W. (1972) *Methods Enzymol.* 25, 326-332
89. Zabin, I. & Fowler, A. V. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5432-5435
90. Bornstein, P. & Balian G. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 132-145
91. Yamamoto, K., Sekine, T., & Kanaoka, Y. (1977) *Anal. Biochem.* 79, 83-94
92. Ida, N. & Tokushige, M. (1985) *J. Biochem.* 98, 793-797
93. Goad, W. B. & Kanehisa, M. I. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 247-263
94. Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., & Orcutt, B. C. (1978) in "Atlas of Protein Sequence and Structure" (Dayhoff, M. O., ed.) Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-352
95. Kubota, Y., Takahashi, S., Nishikawa, K., & Ooi, T. (1981) *J. Theor. Biol.* 91, 347-361
96. Kubota, Y., Nishikawa, K., Takahashi, S., & Ooi, T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 701, 242-252
97. Otaka, E., Ooi, T., Kumazaki, T., & Itoh, T. (1985) *J. Mol. Evol.* 21, 339-345
98. Edman, P. (1949) *Arch. Biochem. Biophys.* 22, 475-476
99. Smando, R., Waygood, E. B., & Sanwal, B. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 182-190
100. Sugino, Y., Tsunasawa, S., Yutani, K., Ogasahara, K., & Suzuki, M. (1980) *J. Biochem.* 87, 351-354
101. Hirs, C. H. W. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 197-199
102. Simpson R. J., Neuberger, M. R., & Liu, T.-Y. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1936-1940
103. Yamamoto, K. & Sekine, T. (1978) *Anal. Biochem.* 90, 300-308
104. Izui, K., Matsuda, Y., Kameshita, I., Katsuki, H., & Woods, A. E. (1983) *J. Biochem.* 94, 1789-1795
105. Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132

106. Lipkin, V. M., Modyanov, N. N., Marchenko, T. V., Chertov, O. Yu., & Ovchinnikov, Yu. A. (1980) in "Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis" (Birrer, Chr., ed.) pp. 453-457, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
107. Rubin, R. A., Modrich, P., & Vanaman, T. C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 2140-2142
108. Green, P. R., Vanaman, T. C., Modrich, P., & Bell, R. M. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10862-10866
109. Tsunasawa, S., Stewart, J. W., & Sherman, F. (1985) J. Biol. Chem. 260, 5382-5391
110. Titani, K., Koide, A., Hermann, J., Ericsson, L. H., Kumar, S., Wade, R. D., Walsh, K. A., Neurath, H., & Fischer, E. H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4762-4766
111. Stephens, P. E., Darlison, M. G., Lewis, H. M., & Guest, J. R. (1983) Eur. J. Biochem. 133, 155-162
112. Herdon, C. S. & Hartman, F. C. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3102-3110
113. Cook, C. M., Spellman, M., Tolbert, N. E., Stringer, C. D., & Hartman, F. C. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 240, 402-412
114. Igarashi, Y., McFadden, B. A., & El-Gul, T. (1985) Biochemistry 24, 3957-3962
115. Estelle, M., Hanks, J., McIntosh, L., & Somerville, C. (1985) J. Biol. Chem. 260, 9523-9526
116. Zoller, M. J. & Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500
117. Maizel, J. V. & Lenk, R. P. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 7665-7669
118. Schulz, G. E. & Schirmer, R. H. (1979) "Principles of Protein Structure", pp. 224-226, Springer, New York
119. Möller, W. & Amons, R. (1985) FEBS Lett. 186, 1-7
120. Robson, R. L. (1984) FEBS Lett. 173, 394-398